

Bindungseigenschaften
monoklonaler Antikörper
gegen experimentelle Gliome
in vitro und in vivo

Werner Mellert

*Diss
München
1985*

Aus dem Institut für Tierpathologie der
Universität München

Arbeit angefertigt unter Leitung von
Prof. Dr. Dr. D. Stavrou

Bindungseigenschaften monoklonaler Antikörper gegen
experimentelle Gliome in vitro und in vivo

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde der
Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

von
Werner Mellert
aus Horb am Neckar
München 1984

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Universität München

Dekan:	Prof. Dr. W. Leidl
Referent:	Prof. Dr. Dr. D. Stavrou
Korreferent:	Prof. Dr. B. Gedek

Tag der Promotion: 22. Februar 1985

DISSERTATIONS - UND FOTODRUCK FRANK GmbH
8000 München 2, Gabelsbergerstraße 15, Tel. 2809090

Meinen Eltern



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41554826_0074

INHALTSÜBERSICHT

Seite

A. EINLEITUNG	3
B. LITERATURÜBERSICHT	4
I. Antigenität von Hirntumoren	4
II. Monoklonale Antikörper	5
III. Nachweis und Reinigung monoklonaler Antikörper	7
IV. Microcytotoxicitätstest	9
V. Externe Szintigraphie	10
VI. Heterogenität von Tumoren	12
C. PROBLEMSTELLUNG	15
D. EIGENE UNTERSUCHUNGEN	16
I. Material und Methoden	16
1. Versuchstiere	16
2. Zellmaterial	16
2.1. Zellkulturen	16
2.1.1. Permanente Gliomzelllinien	16
2.1.2. Myelomzelllinie	17
2.1.3. Hybridomzelllinien	17
2.1.4. Mäuseperitonealzellen	18
2.1.5. Hirnzellkulturen	18
3. Konservieren von Zellen und Hybridomprodukten	19
4. Klonierung der Hybridome	19
5. Mikro-ELISA	20
6. Indirekte Immunperoxidasefärbung	21
7. Ammoniumsulfatpräzipitation zur Anreicherung von Immunglobulinen	22
8. Agargel-Immundiffusion	22
9. Ascitesgewinnung	23
10. Reinigung der Immunglobuline mittels Protein-A-Sepharose-Säule	23

	Seite
11. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	24
12. Microcytotoxizitätstest	26
13. ^{51}Cr -Release-Test	27
14. Veränderungen der Tumorzellen unter Antikörpereinwirkung in vitro	28
15. Tumorwachstumsdepression in vitro	29
16. Markierung der Antikörper mit ^{131}J	29
17. Externe Szintigraphie	30
18. Verteilung des ^{131}J -14 AC1-Antikörpers in vivo	31
 II. ERGEBNISSE	 32
1. Klonierung der Hybridome	32
2. Indirekte Immunperoxidasefärbung	33
3. Immundiffusion und SDS-Polyacrylamid-Gel- elektrophorese	33
4. Ascitesproduktion	35
5. Reinigung der Immunglobuline	38
6. Microcytotoxizitätstest	38
7. Wachstumsdepression in vitro	42
8. Rasterelektronenmikroskopische Befunde an den Gliomzellen nach Einwirkung des monoklonalen Antikörpers 14 AC1	47
9. Externe Szintigraphie und Verteilung des ^{131}J -14 AC1-Antikörpers in vivo	49
 E. DISKUSSION	 55
 F. ZUSAMMENFASSUNG - SUMMARY	 62
 G. LITERATURVERZEICHNIS	 65

A. EINLEITUNG

Die Antigenität spontaner und experimentell induzierter Hirntumoren gilt als gesichert (Pfreundschuh et al., 1978; de Tribolet et al., 1980; Stavrou et al., 1982). Die humorale bzw. zellvermittelte Immunantwort deutet auf die Existenz von gliomassoziierten Antigenen (GAA) auf der Zelloberfläche von spontanen (Kornblith et al., 1974; Wahlström et al., 1974; Wikstrand et al., 1977) und chemisch induzierten (Cravioto et al., 1978; Stavrou et al., 1978a,b, 1980; Bilzer et al., 1982) neurogenen Tumoren hin. Polyklonale Antisera sind jedoch bezüglich ihrer Spezifität und Reinheit sehr heterogen. Erst durch die Hybridomtechnologie, die von Köhler und Milstein (1975) eingeführt wurde, konnten Antikörper einer definierten Spezifität und hohen Reinheit in gewünschter Menge hergestellt werden.

Die bislang durchgeführten Untersuchungen unter Verwendung monoklonaler Antikörper gegen Gliome des Menschen zeigten, daß die GAA, die von den Antikörpern erkannt wurden, teilweise auch bei anderen Tumoren neuroektodermalen Ursprungs (Melanome, Gliome und Neuroblastome) nachgewiesen werden konnten (Seeger et al., 1981; Wikstrand et al., 1982). Auch bei verschiedenen chemisch induzierten Glioblastomen der Ratte wurden mit Hilfe monoklonaler Antikörper teilweise identische GAA gefunden (Stavrou et al., 1983).

Der Einsatz von monoklonalen Antikörpern für Diagnose und möglicherweise Therapie maligner neurogener Tumoren würde einen wesentlichen Fortschritt in der Tumorummunologie bedeuten. Sie könnten als Trägermoleküle für radioaktive Substanzen fungieren und auf diese Weise der Diagnose von Gliomen oder deren Metastasen dienlich sein. Auch wäre eine Therapie mittels "Immuntoxinen" (Vitetta et al., 1983), das heißt an monoklonale Antikörper gebundene cytotoxische Substanzen, bei gliomtragenden Patienten denkbar. Dies wäre insbesondere deshalb wichtig, da eine ganze Reihe von Gliomen chirurgisch unzugänglich und mittels Strahlen- und Chemotherapeutika kaum beeinflußt werden können (Mahaley, 1972).

B. LITERATURÜBERSICHT

I. Antigenität von Hirntumoren

Es gilt als gesichert, daß Tumorzellen Oberflächenantigene exprimieren, die bei normalen Zellen nicht vorhanden sind (Klein, 1966; Hellström et al., 1969; Old et al., 1969; Baker et al., 1973; Warnatz, 1975; Herbermann, 1977; Ghose et al., 1981). Auch bei spontanen sowie experimentell induzierten Hirntumoren wurden solche "gliomassoziierten Antigene" (GAA) entweder durch Untersuchung der humoralen oder zellulären Immunantwort von Gliompatienten (Sheik et al., 1977; Pfreundschuh et al., 1978; Coakham et al., 1980) oder durch Herstellung von Heteroantisera gegen diese Tumoren nachgewiesen (Trouillas, 1971; Coakham, 1974; Wahlström et al., 1974; Wikstrand et al., 1977, 1979; Stavrou et al., 1978 b). In einigen Untersuchungen wird über antigene Eigenschaften nitrosamidinduzierter neurogener Tumoren berichtet (Cornain et al., 1975; Stavrou et al., 1976, 1977, 1978; Cravioto, 1978). Pfreundschuh et al. (1978) definierten drei Klassen von Zelloberflächenantigenen bei Astrocytomen: (a) Antigene, die nur bei Astrocytomen auftreten, (b) Antigene, die sowohl bei Astrocytomen als auch bei Neuroblastomen, Sarkomen und einigen Melanomzelllinien, jedoch nicht bei Carcinomen und normalen Zellen auftreten und (c) Antigene, die bei normalen wie auch malignen Zellen zu finden sind. Die Untersuchungen von Wikstrand et al. (1979) und Schnegg et al. (1981) brachten ähnliche Ergebnisse. Fields et al. (1975) erzielten vergleichbare Resultate auch bei nitrosoharnstoff-induzierten Tumoren des Nervensystems. Kreuzreagierende Antigene wurden sowohl bei Hirntumoren des Menschen (Coakham, 1974; Kornblith et al., 1974; Wahlström et al., 1974; Wikstrand et al., 1977; Pfreundschuh et al., 1978; Coakham et al., 1980) als auch bei chemisch induzierten Tumoren nachgewiesen (Steele et al., 1974; Herbermann, 1977; Hellström et al., 1978). Insbesondere bei Tumoren neuroektodermalen Ursprungs wurden gemeinsame Antigene gefunden (Seeger et al., 1981; Carrel et al., 1982).

II. Monoklonale Antikörper

Die Gewinnung bzw. Reindarstellung von Antikörpern gegen tumorassoziierte Antigene aus dem Serum von Tumorträgern ist infolge der begleitenden Antikörperpopulationen und des niedrigen Antikörpertiters nahezu unmöglich. Die Herstellung von Antikörpern einer einzigen Spezifität wurde durch die Produktion monoklonaler Antikörper möglich. Köhler und Milstein (1975) konnten durch Verschmelzung einer immunglobulinproduzierenden Myelomzelle mit einer sensibilisierten Milzzelle eine Hybridzelle herstellen, die die Eigenschaft beider Eltern behielt. Ein wichtiger Schritt dafür war die von Littlefield (1964) entwickelte Methode, die die Selektion der verschmolzenen von den nicht verschmolzenen Zellen durch Verwendung eines Hypoxanthin-, Aminopterin- und Thymidin-haltigen Mediums erlaubt. Als Fusionspartner werden heute vorwiegend Myelomzellen verwendet, die entweder keine Immunglobulinketten sezernieren (Köhler et al., 1976 a) oder solche, die keine synthetisieren (Shulman et al., 1978; Kearny et al., 1979). Dadurch erhält man Hybridome, die nur die von DNA-Sequenzen des B-Zell-Partners exprimierten monoklonalen Antikörper sezernieren. Ein großes Problem bei der Hybridomtechnologie ist jedoch die Instabilität der Klone (Köhler, 1980). Sie rührt einerseits von dem Überwuchern der antikörperproduzierenden durch nichtproduzierende Kolonien (Gerhard et al., 1978), andererseits von dem Chromosomenverlust der mit einem annähernd vierfachen Chromosomensatz ausgerüsteten Zellen her (Köhler et al., 1978). Diese negativen Erscheinungen lassen sich durch wiederholtes Klonieren antikörperproduzierender Hybridome im "soft-agar"-Verfahren (Coffino et al., 1972), mit der "mini-cloning"-Prozedur (Minna et al., 1981) oder mit der Endpunktverdünnungsmethode ("limiting dilution", Lefkovits, 1972) verringern. Die Produktion monoklonaler Antikörper hat die Tumorserologie in der Weise revolutioniert, daß nun Tumorantigene präziser untersucht und neue Tumorantigene definiert werden konnten. So wurden monoklonale Antikörper gegen eine Vielzahl von Tumoren des Menschen entwickelt, wie z. B.

Melanome (Koprowski et al., 1978; Herlyn et al., 1979, 1980; Yeh et al., 1979; 1981; Dippold et al., 1980; Seeger et al., 1981; Carrel et al., 1982; Garrigues et al., 1982; Libert et al., 1983; Mitchell et al., 1981; Vollmers et al., 1983; Lindmo et al., 1984), Lungencarcinom (Minna et al., 1981), Kolorektalcarcinom (Herlyn et al., 1978; Koprowski et al., 1979; Gilliland et al., 1980), Lymphom (Nadler et al., 1980), Osteosarkom (Feit et al., 1983), Gliome (Schnegg et al., 1981; Seeger et al., 1981; Sikora et al., 1981, 1982; Carrel et al., 1982; de Muralt et al., 1982; Wikstrand et al., 1982; Fabre et al., 1982; Bourdon et al., 1983), Neuroblastome (Eisenbart et al., 1979; Kennet et al., 1979, 1980; Seeger et al., 1981; Carrel et al., 1982) sowie Blasencarcinom (Fradet et al., 1984). Auch gegen Tumorantigene tierischer Herkunft wurden monoklonale Antikörper produziert wie z. B. das Myelom der Maus (Galfre et al., 1979, Fazekas et al., 1980), Glioblastom der Ratte (Stavrou et al., 1982), Fibrosarkom der Ratte (North et al., 1982, 1983) und Hepatocarcinom beim Meerschweinchen (Bernhard et al., 1983).

Die Untersuchungen mit monoklonalen Antikörpern ergaben verschiedene Arten von Antigenen: während manche Untersucher monoklonale Antikörper produzierten, die nur mit Melanomantigenen reagierten (Garrigues et al., 1982; Ross et al., 1982; Hellström et al., 1983; Libert et al., 1983), konnten andere (Mitchell et al., 1981; de Muralt et al., 1982) sowohl an Melanomen als auch an Tumoren glialen Ursprungs dieselben Antigene nachweisen. Seeger et al. (1981) beschrieben zwei monoklonale Melanomantikörper, die auch Antigene auf Gliomen, Melanomen, Neuroblastomen und fetalen Hirnzellen erkannten, während mit adulten Hirnzellen, Karzinomen oder Teratomen keine Reaktion festzustellen war. Carrel et al. (1982) wiesen mit fünf verschiedenen monoklonalen Antikörpern Antigene nach, die auf Gliomen und Neuroblastomen zu finden waren. Wikstrand et al. (1982) fanden Kreuzreaktionen von monoklonalen Antikörpern gegen fetale Hirnzellen des Menschen mit Glioblastomen, Melanomen und Neuroblastomen, jedoch nicht mit normalem adulten Gewebe oder Tumoren anderer Keimblätter. Ähnliche Ergebnisse erzielten auch Kennet et al (1979, 1980).

III. Nachweis und Reinigung monoklonaler Antikörper

Eines der Probleme der Hybridomentechnologie ist das "screening" einer großen Zahl von Überständen, um die Hybridome der gewünschten Spezifität zu erhalten. Deshalb müssen die Nachweisverfahren der Immunglobuline schnell und einfach sein.

Der "enzyme-linked-immunosorbent assay" (ELISA) wurde von Engvall et al. (1971) entwickelt und basiert auf der Verwendung von enzymkonjugierten Antikörpern. Die Vorteile dieses Tests gegenüber radioaktiv markierten oder fluoreszierenden Antikörpern liegen darin, daß er einfacher, schneller, quantitativ und sehr sensitiv ist, wobei die Proben über längere Zeit aufbewahrt werden können (Buchanan et al., 1981). Auch die Spezifität ist mit dem Radioimmunoassay (Suter et al., 1980) oder mit der Immunfluoreszenztechnik (Nakane et al., 1966) vergleichbar. Der mikro-ELISA wurde erst an isolierten Antigenen (Kearny et al., 1979; Pateraki et al., 1981) und an fixierten Zellen durchgeführt (Douillard et al., 1980; Suter et al., 1980; Handley et al., 1982). Um Veränderungen der Zelloberflächenantigene durch die Fixierung auszuschließen, wurde der Test auch an unfixierten Zellpräparationen durchgeführt (Possner et al., 1982; Morris et al., 1982; Feit et al., 1983). Je nachdem, ob die Reaktion lichtmikroskopisch, elektronenmikroskopisch oder photometrisch ausgewertet werden soll, werden verschiedene Substrate verwendet (3, 3 Diaminobenzidin, Dubois-Dalcq et al., 1977; Landsdorp et al., 1980; 3-amino-9-äthylcarbazol; Graham, 1965; Nexo, 1977; ortho-Phenyldiamin, Possner et al., 1982). Als weiteres "screening"-Verfahren wurde die indirekte Immunperoxidasefärbung verwendet. Sie beruht auf der Fähigkeit des Peroxidase-Systems, bei gewissen oxidablen Substraten eine sichtbare Dunkelfärbung zu erzielen (Pearse, 1972). Nexo (1977) konnte unter Verwendung von 3-amino-9-äthylcarbazol Infektionen mit Maus-Leukämievirus an Zellen nachweisen. Landsdorp et al. (1980) verwendeten die Färbung zum Nachweis monoklonaler Antikörper an Monolayern von fixierten Zellen. Auch an Gefrierschnitten konnten monoklonale Antikörper mittels der indirekten

Immunperoxidasefärbung sichtbar gemacht werden (Kennet et al., 1980; Arklie et al., 1981; Mattes et al., 1983; Weij et al., 1983).

Die Konzentration von Antikörpern im Hybridomüberstand liegt bei 10-100 µg/ml (Secher, 1980). Eine maximale Immunglobulin-ausbeute ist dadurch möglich, daß man die Hybridomkultur dichtwachsen läßt und den Überstand erst nach eingetretenem Zelltod gewinnt (Goding, 1980). Da für einige Versuche noch höhere Antikörperkonzentrationen notwendig sind, können die Immunglobuline durch Ammoniumsulfatpräzipitation konzentriert werden (Fey et al., 1976; Jonak, 1980). Die höchsten Antikörpertiter sind durch in vivo-Anzüchtung der Hybridome als Subcutan- oder Ascitestumoren zu erreichen. Das Serum von thymuslosen BALB/c-Mäusen mit subcutan transplantierten Hybridomen enthält 3-15 mg spezifischen Antikörper/ml (Goding, 1980). Ähnliche Konzentrationen sind in der Ascitesflüssigkeit von Tieren zu finden, denen 2-4 Wochen zuvor 10^6 Hybridomzellen intraperitoneal injiziert worden waren (Köhler et al., 1976b). Die Ascitesproduktion kann durch die intraperitoneale Verabreichung von 2,6,10,14-Tetramethylpentadekan (Pri-stane^(R)) ca. 3 Wochen vor der Transplantation gefördert werden (McKearn, 1980). Lostrom et al. (1979) erzielten dadurch eine Immunglobulinkonzentration im Ascites von 25-75 mg/ml. Die Injektion von Freund'schem Adjuvans (Tung et al., 1976) oder Antilymphocytenseren (McKearn, 1980) vor der Hybridomtransplantation hatte ebenfalls eine höhere Antikörperkonzentration sowie eine höhere Tumorträgerate zur Folge. Zur Isolierung und Reinigung von Immunglobulinen mittels Affinitätschromatographie ist Protein-A-Sepharose das Mittel der Wahl. Goding (1978) isolierte damit Immunglobulin G aus Human- und Kaninchenserum, Ey et al. (1978) konnten Immunglobulin G-Unterklassen aus Mäuseseren trennen. Protein-A ist ein Hauptbestandteil der Zellwand der meisten Stämme von *Staphylococcus aureus*. Es hat eine sehr hohe Affinität zu Immunglobulinen, insbesondere zu IgG (Goding, 1978). Auch monoklonale Antikörper lassen sich aus Ascitesflüssigkeit

(Epenetos et al., 1982b; Farrands et al., 1982; Pimm et al., 1982; Herlyn et al., 1983) oder Hybridomüberstand (Goding, 1980; Underwood et al., 1983) mittels einer Protein-A-Sepharosesäule reinigen. Dabei ist jedoch eine mögliche Mitisolierung von unspezifischen IgG der Maus oder bovinen Immunglobulinen aus dem Serum des Mediums zu beachten (Underwood et al., 1983). Über das Bindungsverhalten von Maus-IgG liegen verschiedene Aussagen vor. Während Goding (1978) feststellte, daß sich von Maus-IgG besonders IgG_{2a}, IgG_{2b}, IgG₃, jedoch nur Spuren von IgG₁ binden, konnten Ey et al. (1978) durch Verwendung von kleineren Proben (2,5-5 ml) eine vollständige Bindung von IgG₁ erzielen.

Eine erste Charakterisierung von Immunglobulinketten ist durch die SDS-PAGE (Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese) möglich. Lämmli (1970) verbesserte die Methodik der Gelelektrophorese und konnte so im Kopf des Bakteriophagen T4 einige bislang unbekannte Proteine nachweisen. Galfre et al. (1979) zeigten mittels der Elektrophorese, daß ihre Hybridome andere H- und L-Ketten sezernieren als die zur Fusion verwendete Myelomlinie. Auch andere Autoren, die zur Fusion nicht Immunglobulin-produzierende Myelomlinien verwendeten, fanden neue H- und L-Ketten (Köhler et al., 1976a; Shulman et al., 1978; Trowbridge, 1978; Kennett et al., 1980; Olsson et al., 1980, 1983).

IV. Mikrocytotoxizitäts-Test (MCT)

Immun-Cytotoxizitätstests stellen die direkteste Methode in vitro zur gleichzeitigen Untersuchung sowohl der Oberflächenantigenexpression von Tumorzellen als auch der Zellzerstörung auf immunologischer Basis dar (Wood et al., 1970). Die Aktivität humoraler cytotoxischer Antikörper ist abhängig von Komplement (C) (Hellström et al., 1968). C ist ein hitze-labiler Serumbestandteil (Inaktivierung bei 57°C in 30 Minuten) und besteht aus neun Faktoren, die in einer bestimmten Reihenfolge reagieren. Während die Faktoren C1 - C7 vor allem für die Bindung an den Antigen-Antikörper-Komplex

verantwortlich sind, bewirken die Faktoren C8 und C9 eine irreparable Schädigung der Zellmembran (Humphrey und White, 1971). Der Grad der Zellschädigung ist durch verschiedene Methoden meßbar. So kann die Schädigung der Targetzellen entweder lichtmikroskopisch durch Veränderung der Morphologie (Wood et al., 1970; Lemke et al., 1978; Elling et al., 1980) oder durch Anfärben mit Trypanblau (Fields et al., 1975; Gasser et al., 1979) festgestellt werden. Eine andere Möglichkeit besteht darin, die Targetzellen mit ^{14}C (Wikstrand et al., 1979), ^{51}Cr (Springer et al., 1978; Eisenbarth et al., 1979; Starkey et al., 1982) oder ^{125}J (Ralph et al., 1983) zu markieren und den Grad der Cytotoxizität an der Zahl der freigesetzten "counts per minute" zu ermitteln. Als cytotoxische Antikörper können Heteroantisera (Fields et al., 1975; Wikstrand et al., 1979), Serum von Tumorträgern (Wood et al., 1970) oder monoklonale Antikörper (Lemke et al., 1978; Springer et al., 1978; Eisenbarth et al., 1979; Gasser et al., 1979; Bernstein et al., 1982; Ralph et al., 1983; Stavrou et al., 1984) verwendet werden. Starkey et al (1982) gelangen mittels des MCT eine Immunselektion von Tumorzellvarianten einer Epitheloidzelllinie, auf die der spezifische monoklonale Antikörper keine cytotoxische Wirkung mehr hatte. Die Spezifität des Komplements ist gering (Humphrey und White, 1971), so daß im allgemeinen Komplement jeder Spezies mit Antikörpern jeder anderen Spezies reagiert.

V. Externe Szintigraphie

Ein wichtiger Schritt für die Diagnose von Tumoren mittels radioaktiv markierten Antikörpern waren die Untersuchungen von Pressman et al. (1949), die zeigten, daß Antiseren erfolgreich radioaktiv markiert werden können, ohne daß dadurch ihre Spezifität zerstört wird. Mit Hilfe jodierter Kaninchenantisera gegen Mäusenieren konnte eine Anreicherung der Radioaktivität in vivo nachgewiesen werden. Eine erste in-vivo-Diagnose von Tumoren mittels radioaktiv markierten Antiseren gelangen Pressman und Korngold (1953) mit Kaninchen-Antiseren

gegen das Wagner-Osteosarkom der Maus. Durch Verwendung von polyklonalen Heteroantisera gegen Tumoren (Marrack et al., 1967) bzw. über Affinitätschromatographie gereinigte Immunglobulinfraktionen davon, konnten z.B. Coloncancerome (GW-39) in Hamstern (Goldenberg et al., 1974; Primus et al., 1977) und Ovarialcancerome beim Menschen (van Nagell et al., 1980) diagnostiziert werden. Die Schwierigkeiten hierbei waren jedoch Kreuzreaktionen mit normalem Gewebe. Bei diesen Untersuchungen war deshalb eine Subtraktion der Radioaktivität mittels Computer notwendig, um den Background abzuziehen und den Ziel-tumor zu entdecken.

Durch die Verwendung von radioaktiv markierten monoklonalen Antikörpern zur Darstellung von Tumoren in vivo können unspezifische Kreuzreaktionen mit normalem Gewebe weitgehendst vermieden werden. So konnten Bourdon et al. (1983) mit ¹³¹Jod-markierten monoklonalen Antikörpern gegen ein in Mäuse transplantiertes Gliom des Menschen 48 Stunden nach Injektion eine deutliche Anreicherung der Radioaktivität im Tumorgewebe nachweisen. Diese Anreicherung war durch externe Gammakamera-Szintigraphie wie auch durch Messung der spezifischen Aktivität (cpm/mg) der einzelnen Gewebe zu erkennen. Die Spezifität der Methode wurde noch durch Abzug des Durchblutungseffektes mittels eines ¹²⁵Jod-markierten unspezifischen monoklonalen Antikörpers derselben Immunglobulin-klasse wie der spezifischen Antikörper gesteigert. Auch andere Autoren (Ballou et al., 1979; Epenetos et al., 1982a,b; Weinstein et al., 1982, 1983; Baldwin et al., 1983; Strand et al., 1984) verwendeten diese "paired-label"-Methode zur Steigerung der Spezifität der in vivo-Darstellung. Zur Anreicherung der monoklonalen Antikörper im Tumor wurden verschiedene Angaben gemacht: während Pimm et al. (1982) 6 Tage nach Injektion 20% der noch vorhandenen Radioaktivität im Tumor fand, erreichten Hedin et al. (1982) 4 Tage nach Injektion des markierten monoklonalen Antikörpers eine Anreicherung bis zu 40%. Durch Verwendung von F(ab')₂-Fragmenten der monoklonalen Antikörper erzielten Herlyn et al. (1983) bessere Ergebnisse im Vergleich

zum intakten IgG. Zur Markierung der Antikörper wurde meist ^{131}Jod (Ballou et al., 1979; Mach et al., 1981; Phillips et al., 1983) oder ^{125}Jod (Epenetos et al., 1982c) verwendet. Scheinberg et al. (1982) verwendeten $^{111}\text{Indium}$, das wegen seiner niedrigen Halbwertszeit eine geringere Patientenbelastung mit sich bringt. Neben der externen Gamma-Szintigraphie wurde auch die Autoradiographie (Moshakis et al., 1981a,b; Epenetos et al., 1982b; Weinstein et al., 1983; Ballou et al., 1984) zur histologischen Darstellung der Anreicherung radioaktiv markierter monoklonaler Antikörper im Tumorgewebe verwendet. Einige diagnostische Versuche mit radioaktiv markierten monoklonalen Antikörpern wurden auch beim Menschen durchgeführt. So konnten Farrands et al. (1982) mit monoklonalen Antikörpern gegen ein Colorectalcarcinom bei 10 von 11 Patienten eine Anreicherung im Tumor feststellen. Mach et al. (1981) und Epenetos et al. (1982b) erzielten ähnliche Ergebnisse, die durch Autoradiographie des chirurgisch entfernten Tumorgewebes verifiziert wurden. Über die Darstellung eines Glioms bei einem Patienten unter Verwendung monoklonaler Antikörper berichten Phillips et al. (1983).

VI. Heterogenität

Die Heterogenität von Tumoren findet in der letzten Zeit zunehmendes Interesse. So berichteten Dexter et al. (1981), daß sich die Zellen einer frühen Phase eines humanen Colonadenocarcinoms in Karyotyp, Morphologie und Klonierungsrate unterscheiden. In thymuslose Mäuse subcutan transplantierte Zelllinien erzeugten histologisch unterschiedliche Tumoren. Mit Hilfe von Lymphocyten immunisierter Tiere konnten immunologische Unterschiede zwischen einem primären methylocholanthren-induzierten Fibrosarkom und dessen Lungenmetastasen festgestellt werden (Faraci, 1974). Daraus wurde gefolgert, daß Metastasen zwar einige Antigene mit dem Primärtumor gemeinsam haben, aber daneben noch "Neoantigene" besitzen, die sie immunologisch vom Primärtumor unterscheiden.

Bei einem Mammaadenocarcinom der Maus wurde bei 5 Subpopulationen mit Hilfe von sensibilisierten Lymphocyten in ^{51}Cr -Release- und Microcytotoxizitätstests immunologische Unterschiede festgestellt (Miller et al., 1979). Suzuki et al. (1978) konnten eine unterschiedliche Koloniebildung in der Lunge durch intravenöse Injektion von Klonen eines Mausfibrosarkoms nachweisen. Auch in Bezug auf Sensitivität gegenüber Cytostatica verhalten sich Tumorzellpopulationen unterschiedlich. So hatte die Behandlung von 3 Subpopulationen eines Mammaadenocarcinoms der Maus mit Cyclophosphamid, Methothrexat und 5-Fluorouracil unterschiedliche Wirkung. In vivo konnte damit nur ein Teil der Tumoren supprimiert werden, manchmal wurde sogar ein "Enhancement" der Metastasenbildung festgestellt (Heppner et al., 1978). Kimball et al. (1980) konnten eine 5-Fluorouracil-resistente Zellpopulation aus einer Coloncarcinomlinie des Menschen isolieren, die licht- und elektronenmikroskopisch strukturelle Veränderungen zeigte. Die Heterogenität äthylnitroscharnstoff-induzierter neurogener Rattentumoren wiesen Laerum et al. (1983) durch unterschiedlichen DNA-Gehalt und eine veränderte Ploidie der Zellen in vivo und in vitro nach. Stavrou et al. (1978) zeigten, daß eine unterschiedliche Anzahl von Zellen chemisch induzierter Rattengliome mit polyklonalen Antiseren nicht reagiert. Starkey et al. (1982) isolierten durch "Immunselektion" Tumorzellvarianten, die bei Behandlung mit einem cytotoxischen Antikörper nicht mehr reagierten.

Durch die Entwicklung monoklonaler Antikörper wurde die Untersuchung der Heterogenität wesentlich vereinfacht, da die Spezifität der Antikörper sehr hoch ist. Es zeigte sich, daß bei indirekten Immunofluoreszenztests mit monoklonalen Antikörpern nicht alle Zellen positiv reagierten (Yeh et al., 1981; Herrmann et al., 1983; Natali et al., 1983; Stavrou et al., 1983). Auch Cytotoxizitätstests unter Verwendung monoklonaler Antikörper mit Komplement (Yeh et al., 1981; Stavrou et al., 1984) und ohne Komplement (Dippold et al., 1984) brachten ähnliche Ergebnisse. Bei einer Gliomzelllinie des

Menschen wiesen Wikstrand et al. (1983) unter Verwendung monoklonaler Antikörper mit Hilfe der Peroxidase-anti-Peroxidase-Immunhistologie heterogene Zellpopulationen nach.

Bernstein et al. (1982) konnten durch in vivo-Behandlung an Leukämie erkrankter Mäuse mit monoklonalen Antikörpern Zellen isolieren, die das Thyl-Differenzierungsantigen, gegen das der monoklonale Antikörper gerichtet war, nicht exprimierten.

C. Problemstellung

Chirurgische Maßnahmen, Strahlen- oder Chemotherapie erwiesen sich bei malignen Gliomen oft als wenig wirkungsvoll (Mahaley, 1972). Der mögliche Einsatz von monoklonalen Antikörpern, die gegen gliomassoziierte Antigene gerichtet sind, würde einen wesentlichen Fortschritt für die Diagnose und möglicherweise Therapie von neurogenen Tumoren bedeuten. Sie könnten als Trägermoleküle radioaktiver oder cytotoxischer Substanzen dienlich sein und so eine erfolgversprechende Immuntherapie ermöglichen.

Am Beispiel von monoklonalen Antikörpern, die gegen chemisch induzierte Rattengliome gerichtet sind (Stavrou et al., 1982), soll die Möglichkeit der in vivo-Diagnose von Tumoren mittels radioaktiv markierten monoklonalen Antikörpern untersucht werden.

Darüber hinaus soll geprüft werden, ob monoklonale Antikörper eine direkte oder komplementvermittelte cytotoxische Wirkung auf Gliomzellen haben.

D. EIGENE UNTERSUCHUNGEN

I. Material und Methoden

1. Versuchstiere

Als Versuchstiere dienten 6-8 Wochen alte männliche BALB/c-nu/nu-Mäuse, BALB/c-Mäuse beiderlei Geschlechts, sowie neugeborene Fischer-Ratten (F344), die unter gleichen Bedingungen gehalten wurden. Die Standarddiät war Altromin^R und Wasser ad libitum.

2. Zellmaterial

2.1. Zellkulturen

2.1.1. Permanente Gliomzelllinien

Es wurden die Gliomzelllinien 79FR-G-41, 78FR-G-219, 78FR-G-284 und 78FR-G-299 verwendet, die aus chemisch induzierten Rattengliomen isoliert worden waren (Stavrou et al., 1980). Zur Kultivierung dieser Gliomzelllinien wurden 50 ml- oder 260 ml Plastikflaschen (Nunc^(R), 1-53732) verwendet, als Nährmedium diente Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, Gibco, Kat. Nr. 074-2100), welches pro Liter 10% fetales Kälberserum (FKS, Flow Lab., Bonn), 100.000 I.E. Penicillin G, 0,1g Neomycin und 0,1g Streptomycin enthielt. Die Zellen wurden bei 37°C im geschlossenen System bebrütet und bei Bedarf im Verhältnis 1:20 bis 1:50 unter Verwendung einer STV-Lösung (100 ml Saline 10-fach, 25 ml 25%ige Trypsinlösung, 50 ml 1,0%ige Versene-Lösung, Aqua bi-dist ad 1000ml) geteilt. Die Gliomzelllinie 79FR-G-41 wurde in regelmäßigen Abständen in 3 Wochen alte Fischer-Ratten intracerebral transplantiert, um die Tumorigenität der Zelllinie zu erhalten. Die durch die in vivo-Passagen gewonnenen Zelllinien wurden 79FR-G-41_{c1-c7} bezeichnet.

2.1.2. Myelomzelllinie

Sowohl für die Fusionsexperimente als auch zur Produktion von Ascitesflüssigkeit für Kontrollexperimente wurde die BALB/c-Mausmyelomzelllinie X63-Ag8.653 verwendet. Diese Linie ist ein Subklon von X63-Ag8, der im Gegensatz zur Ursprungslinie keine nachweisbaren Mengen an γ - und κ -Ketten synthetisiert (Kearny et al., 1979). Die Myelomzellen wurden auf Nunc^(R)-Plastikflaschen unter Verwendung von Minimal Essential Medium mit Earle's Salzen (MEM, Gibco, Karlsruhe) gezüchtet, welches pro Liter 10% FKS, 15 mg Azaguanin, 100.000 I.E. Penicillin und 0,1 g Neomycin enthielt. Die Zellen wurden im Verhältnis 1:2 bis 1:10 geteilt.

2.1.3. Hybridomzellkulturen

Die bei diesen Untersuchungen verwendeten Hybridome wurden durch Fusion von Mausmyelomzellen (X63-Ag8.653) und Splenocyten von BALB/c-Mäusen produziert, die mit der Glioblastomlinie 79FR-G-41 hyperimmunisiert worden waren (Stavrou et al., 1982, 1983). Folgende Hybridomklone fanden Verwendung: 13 GC1, 14 AC1, 14 BC1, 14 KC1, 14 LC1 und 14 ZC1. Die Hybridome wurden in (24)-Linbroplatten (Nunc^(R), 1-45982) oder 50 ml-Plastikflaschen (Nunc^(R), 1-63371) unter Verwendung von Minimum Essential Medium mit Earle's Salzen (MEM, Gibco, Karlsruhe, 072-1100), welches pro Liter 10% FKS, 100.000 I.E. Penicillin, 0,1 g Neomycin, 0,1 g Streptomycin, 13,6 mg Hypoxanthin und 3,87 mg Thymidin enthielt, gezüchtet. Die Zellen wurden bei 37°C und 5% CO₂ im offenen System bei einer gesättigten Wasserdampfatmosphäre bebrütet.

2.1.4. Mäuseperitonealzellen

Als "feeder-layer"-Zellkultur für die Hybridomzellen dienten Peritonealzellen von Mäusen, denen 4-5 Tage vor der Bauchhöhlenspülung 0,7 ml Thioglycollate^(R)-Medium 10 % (Difco Lab., Detroit, USA) intraperitoneal appliziert worden war (Schimmelpfennig et al., 1980). Die Tiere wurden in Äthernarkose durch Genickdislokation getötet und in 70%ige Äthanol-lösung getaucht; die Bauchhaut wurde nach Einschnitten in die Kniefalte abgezogen. Mit 5 ml Hybridomerhaltungsmedium (MEM) wurde unter Verwendung einer weitlumigen Kanüle (0,9 x 35 mm) sorgfältig das Abdomen ausgespült, die Spülflüssigkeit in 0°C vorgekühlte Zentrifugenröhrchen gegeben und nach Unterschichtung mit 2 ml FKS (4°C) 5 Minuten bei 1000 rpm zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in frischem Medium resuspendiert und die Zellzahl auf 10⁶ Zellen/ml eingestellt. Von dieser Zellsuspension wurden pro Vertiefung einer (96)-Mikroplatte 10 µl, pro Vertiefung einer (24)-Linbroplatte 100 µl und in eine 50 ml Plastikflasche 1 ml gegeben.

2.1.5. Hirnzellkulturen

Für die Untersuchung der Bindungsspezifität der erhaltenen monoklonalen Antikörper wurden Hirnzellkulturen neugeborener Fischer-Ratten verwendet. Die Ratten wurden durch Dekapitation getötet und das gesamte Gehirn nach der mechanischen Dissoziationsmethode (Paul, 1980) in Kulturflaschen angelegt. Als Nährmedium diente M 199 (Gibco, Karlsruhe, 400-1200), das 20% FKS, 100.000 I.E. Penicillin G, 0,1 g Neomycin und 0,1 g Streptomycin pro Liter enthielt. Die Zellen wurden im geschlossenen System bei 37°C bebrütet und nach der 2. in vitro-Passage für die Versuche verwendet.

3. Konservieren von Zellen und Hybridomprodukten

Zum Einfrieren der Zellen wurde dem Medium 20% FKS und 10% Dimethylsulfoxyd (DMSO, Serva, Heidelberg) zugesetzt. 10^6 Zellen wurden in 1 ml dieses Mediums suspendiert, 4 Stunden bei 4°C vorgekühlt und dann bei -70°C tiefgefroren (Ashwood-Smith, 1961).

Zum Auftauen wurden die Zellen in einem 37°C warmen Wasserbad innerhalb von 3 Minuten aufgetaut, bei 1000 rpm zentrifugiert und in 1 ml MEM resuspendiert. Die Suspension wurde in eine mit Mäuseperitonealzellen als "feeder-layer" (Hengartner et al., 1978) vorbereitete (24)-Linbroplatte gegeben und bei 37°C in einer 5 %igen CO₂-Atmosphäre bebrütet. Je nach Bedarf wurden die Zellen 1:3 bis 1:10 geteilt bzw. rekloniert. Die Hybridomkulturüberstände, Ascitesflüssigkeit und gereinigte Immunglobulinfraktionen wurden bei -20°C konserviert.

4. Klonierung der Hybridome

Ein Teil der Hybridomzellen stellte während der Kultivierung die Antikörperproduktion ein. Um die nichtproduzierenden Varianten zu eliminieren, wurden die Hybridome nach dem Auftauen und danach in regelmäßigen Abständen rekloniert. In eine mit Mäuseperitonealzellen vorbereitete (96)-Mikrotiterplatte wurden pro Vertiefung 1-3 Hybridomzellen ausgesät und nach Dichtwachsen die Überstände mit Hilfe des mikro-ELISA getestet. Die am besten antikörperproduzierenden Subklone wurden in (24)-Linbroplatten und Zellkulturflaschen vermehrt.

5. Micro-ELISA

Die Quantifizierung der Bindungsreaktivität monoklonaler Antikörper an Zellen wurde nach Angaben von Possner et al. (1982) durchgeführt. 79FR-G-41-Zellen wurden mit STV-Lösung vom Kulturgefäß abgelöst und 2 mal mit PBS-A gewaschen. Danach wurde die Zellzahl auf 5×10^6 Zellen/ml PBS-A + 2, 5% FKS eingestellt und von dieser Suspension 100 μ l pro Vertiefung einer (96)-Polyvinylchlorid-Mikroplatte (Flow Lab, Bonn, 72-176-05) gegeben. Die Platte wurde bei 850 g 3 Minuten lang zentrifugiert und der Überstand abgesaugt. Der erste Antikörper (Kulturüberstände bzw. Ascitesflüssigkeit) wurde in Verdünnungsstufen (20 μ l/Vertiefung) aufgetragen und das Zellpellet darin suspendiert. Es folgte eine Inkubation von 30 Minuten bei 4°C. Danach wurden die Zellen 5 mal mit PBS-A gewaschen. Als zweiter Antikörper diente ein mit PBS-A/2,5% FKS verdünntes Kaninchen-anti-Maus-Immunglobulin, das mit Meerrettichperoxidase konjugiert war (RAM-HRPO, Dako Pl61). Die Inkubation mit dem zweiten Antikörper erfolgte ebenfalls 30 Minuten bei 4°C.

Nach 5 abschließenden Waschungen mit PBS-A wurden 100 μ l/Vertiefung folgenden Substrates zugegeben:

1 mg ortho-Phenylendiamin (Sigma) wurde pro 1 ml 0,1 M Citratpuffer (pH4,5) gelöst und unmittelbar vor Gebrauch mit 4 μ l/ml einer 3%igen H_2O_2 -Lösung versetzt.

Je nach Farbintensität der Reaktion wurde das Substrat nach 10-30 Minuten auf eine (96)-Polyvinylplatte transferriert und die Absorption im Photometer (Titertek Multiscan^(R) MC, Flow Lab.Bonn) bei 492 nm gemessen.

Als Leerwert für die Messung der endogenen Peroxidase dienten Zellen, die nur mit Substrat versetzt worden waren. Zur negativen Kontrolle wurde Myelomüberstand (X63-Ag8.653) genommen, zur positiven Kontrolle Serum von Mäusen, die gegen das Gliom 79FR-G-41 immunisiert worden waren.

6. Indirekte Immunperoxidasefärbung

Als weiterer Antigen-Antikörperbindungsnachweis wurde die indirekte Immunperoxidasefärbung nach Pateraki et al. (1981) verwendet. In Terasakiplatten (Nunc^(R), 1-63118) wurden pro Vertiefung 500-1000 der zu untersuchenden Zellen ausgesät, 24 Stunden bei 37°C bebrütet und in semikonfluentem Zustand nach einmaligem Waschen mit PBS-A 5 Minuten mit Methanol/Aceton 1:1 bei 4°C fixiert. Nach 10-minütiger Lufttrocknung wurde in jede Vertiefung 20 µl des ersten Antikörpers (Hybridomkulturüberstand) gegeben und eine Stunde bei 37°C inkubiert. Danach wurde mit PBS-A 3 mal gewaschen, 10 Minuten inkubiert und wieder 3 mal gewaschen. Als zweiter Antikörper diente Kaninchen-anti-Maus-IgG, das mit Meerrettichperoxidase konjugiert war (RAM-HRPO, Dako). Dieses wurde 1:100 in PBS-A/5% FKS verdünnt und in die Vertiefungen pipettiert (20 µl/Vertiefung). Es folgte wiederum eine einstündige Inkubation bei 37°C.

Nachdem der Waschvorgang mit PBS-A wie nach dem ersten Teil der Färbung abgeschlossen war, wurde zur Sichtbarmachung der Antigen-Antikörperbindung das Substrat nach Nexo (1977) verwendet: 20 mg 3-amino-9-äthyl-Carbazol (Sigma) wurden in 5 ml NN'-Dimethylformamid (Merck) gelöst, in 95 ml 50 mM Acetatpuffer, pH 5, aufgenommen, filtriert und kurz vor Gebrauch mit 50 µl 30%iger H₂O₂-Lösung versetzt.

Das Substrat wirkte ca. 10 Minuten ein, bis makroskopisch eine deutliche Rotfärbung der positiven Kontrollen zu erkennen war. Um die Farbreaktion zu stoppen, wurde gründlich mit Aqua dest. gewaschen und die Platte dann mit Kaiser's Glyceringelatine eingeschlossen. Die Auswertung erfolgte unter dem Lichtmikroskop, wobei 4 Intensitätsgrade unterschieden wurden: stark positive, positive, schwach positive und negative Reaktion. Als positive Kontrolle diente Serum von BALB/c-Mäusen, die gegen das Gliom 79FR-G-41 immunisiert worden waren, in einer Verdünnung von 1:100, als negative Kontrolle diente Kulturüberstand von X63-Ag8.653-Myelomzellen.

7. Ammoniumsulfatpräzipitation zur Anreicherung von Immunglobulinen.

Die zu konzentrierende Probe (Hybridomüberstand bzw. Ascitesflüssigkeit) wurde mit der gleichen Menge einer gesättigten Ammoniumsulfatlösung (1000 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ad 1000 ml Aqua dest., pH mit 30 %iger NaOH auf 7,0 eingestellt) gemischt und eine Stunde bei 0°C inkubiert (Jonak, 1980). Danach wurde das Präzipitat 30 Minuten bei 48.000 g und 4°C zentrifugiert. Nach der Zentrifugation wurde der Überstand dekantiert, das Präzipitat in einer geringen Menge destillierten Wassers resuspendiert und 48 Stunden gegen PBS-A (pH 7,3) dialysiert.

8. Agargel-Immunodiffusion

Zur Bestimmung der Immunglobulinklassen der monoklonalen Antikörper wurden in das zentrale Loch einer Immunodiffusionsplatte (Miles Lab., Elkhart, IN, 642761) 20 µl des durch Ammoniumsulfatpräzipitation 10-fach konzentrierten serumfreien Hybridomüberstandes der verschiedenen Hybridomklone pipettiert (Ouchterlony, 1962). In jedes zweite der peripheren Löcher wurde Kaninchen-anti-Maus-IgG₁ (Miles, Kat.Nr. 64360), Kaninchen-anti-Maus IgG_{2a} (Miles, Kat.Nr. 64361) bzw Kaninchen-anti-Maus IgG_{2b} (Miles, Kat.Nr. 64362) gegeben, dazwischen jeweils PBS-A. Die Platten wurden in eine feuchte Kammer gestellt und die Löcher, wenn nötig, 4 bis 5 mal nachgefüllt. Nach 48 Stunden waren deutliche Präzipitationslinien zu erkennen.

9. Ascitesgewinnung

6-8 Wochen alten BALB/c-Mäusen beiderlei Geschlechts wurden 0,5 ml 2,5,10,14-Tetramethylpentadecan (Pristane^(R), Ega Chemie, Steinheim) intraperitoneal injiziert (McKearn, 1980) und drei Wochen später 10×10^6 Hybridomzellen in die Bauchhöhle transplantiert (Katz et al., 1976). 10 Tage nach der Hybridomtransplantation zeigte sich aufgrund der Ascitesbildung eine birnenförmige Auftreibung des Abdomens. Die Tiere wurden in Äthernarkose durch Genickdislokation getötet und die Bauchhaut abgezogen. Zur Gewinnung der Ascitesflüssigkeit wurde die Bauchhöhle mit einer weitleumigen Kanüle (0,9x35 mm) punktiert und 6-10 ml Flüssigkeit gewonnen. Diese wurde, nachdem die Zellen in 10 Minuten bei 1000 rpm abzentrifugiert worden waren, zur Fibringerinnung eine Stunde bei Raumtemperatur belassen und dann 10 Minuten bei 2000 rpm zentrifugiert. Das flotierende Pristane^(R) wurde abgesaugt und die zellfreie Ascitesflüssigkeit gewonnen.

10. Reinigung der Immunglobuline mittels Protein-A-Sephrose-Säule

Die Reinigung und Isolierung der Immunglobuline aus der präzipitierten Ascitesflüssigkeit erfolgte über eine Protein-A-Sephrose-Säule nach der Methode von Ey et al. (1978) in leicht modifizierter Form.

1,5 g Protein-A-Sephrose (Cl-4B, Pharmacia, 17-0780-01) wurden in 10 ml 0,1 M Natriumhydrogenphosphat (Merck), pH 8,5 und 0,1 mM Thimerosal (Sigma) suspendiert und in eine 5 ml Einmalspritze eingefüllt. Nachdem die Säule mit 30 ml des Phosphatpuffers gewaschen worden war, wurden 5 ml präzipitierte Ascitesflüssigkeit mit derselben Menge Phosphatpuffer gemischt, mit Tris-HCl (Sigma), pH 8,8 auf pH 8 eingestellt und auf die Säule aufgetragen. Nun wurde so lange mit Phosphatpuffer gewaschen, bis die Messung im Spektralphotometer bei A_{280} weniger als 0,05 betrug.

Zur Elution des IgG₁ wurde 0,1 M Citratpuffer (0,1 M Natriumcitrat mit 1 M Zitronensäure auf pH 6 eingestellt) verwendet. IgG₂ wurde mit 0,2 M Glycin-HCl-Puffer (Merck), pH 2,8 eluiert. Es wurden Fraktionen von 2 ml gesammelt (30 Tropfen pro Minute), bis die Messung der Absorption bei 280 nm kleiner als 0,05 war. In die Sammelröhrchen wurden vorher je 2 ml 0,2 M Natriumhydrogencarbonatlösung (Merck) gegeben, um den sauren Puffer sofort zu neutralisieren. Die Fraktionen mit nennenswerten IgG-Mengen (A 0,05) wurden gepoolt und gegen 10 mM Ammoniumhydrogencarbonat (Merck) 2 Tage lang dialysiert (2 x 4 l). Danach wurde das gelöste IgG mittels Kollodiumhülsen (Sartorius) eingeeengt und mit PBS-A auf 1 mg/ml eingestellt. Die vorhandene Menge IgG wurde durch Messung der Absorption bei 280 nm und Berechnung nach der Formel

$$\left[A_{280} \right] : 1,4 = \left[\text{mg/ml} \right]$$

bestimmt (Lemke et al., 1978).

11. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) wurde nach der Methode von Lämmli (1970) durchgeführt.

Zur Trennung des Proteingemisches wurde ein Mittelporgel bei pH 8,9 verwendet, bestehend aus Sammel- und Trenngel. Die Herstellung der Gele erfolgte folgendermaßen:

1. Trenngel:

- Lösung Nummer 1: 28,589 g Tris(hydroxymethyl-)aminomethan (Merck)
0,23 g NNN'-Tetramethylethyldiamin (Serva)
ad 100 ml Aqua dest., mit 1 N HCl auf pH 8,8 eingestellt
- 2: 60,0 g Acrylamid (Serva)
0,4 g NN'-Methylenbisacrylamid (Roth)
ad 100 ml Aqua dest.
- 3: 0,14 g Ammoniumpersulfat (Serva) ad 100 ml Aqua dest.

In einen Glaskolben wurden 0,0378 g Dodecylsulfat-Natriumsalz (Serva) eingewogen und von Lösung Nr. 1 6 ml, von Lösung Nr. 2 7,8 ml und von Lösung Nr. 3 24 ml zugegeben.

2. Sammelgel:

Lösung Nr. 4: 25,6 ml 1 M H_3PO_4 -Lösung

5,7 g Tris(hydroxymethyl-)aminomethan
(Merck) ad 100 ml Aqua dest.

5: 10,0 g NN'-Methylenbisacrylamid (Roth)
ad 100 ml Aqua dest.

6: 4,0 g Riboflavin (Merck) ad 100 ml
Aqua dest.

7: 40,0 g Saccharose (Merck) ad 100 ml
Aqua dest.

Zu 0,016 g Dodecylsulfat-Natriumsalz (Serva) wurden 2 ml von Lösung Nr. 4, 4 ml von Lösung Nr. 5, 2 ml von Lösung Nr. 6 und 8 ml von Lösung Nr. 7 gegeben.

Die Gelröhrchen wurden in die Gießvorrichtung gesteckt und 7 cm mit dem Trenngel gefüllt. Das Trenngel wurde mit 1 ml Aqua dest. überschichtet, um eine Meniskusbildung zu verhindern. Nach einer Polymerisationszeit von 20 Minuten wurde das Wasser abgesaugt und das Sammelgel in einer Höhe von 1 cm zugegeben. Auch das Sammelgel wurde während der Polymerisationszeit mit Aqua dest. überschichtet. Die Gelröhrchen wurden in das vorgekühlte Elektrodengefäß eingedreht und dieses mit Kammerpuffer (0,0025 M Tris(hydroxymethyl-)aminomethan (Merck), 0,192 M Glycin (Merck) und 0,1% Dodecylsulfat-Natriumsalz) gefüllt.

Nach dem Vorlauf (10 Minuten 1 mA/Gel, 60 Minuten 5 mA/Gel), bei dem nur Probenlösung (0,0625 M Tris-HCl, pH 6,8, 2% Dodecylsulfat-Natriumsalz, 10% Glycerol, 5% 2-Mercaptoäthanol, 0,001% Bromphenolblau) eingefüllt worden war, wurden die Gelröhrchen mit der Probe (50 μl Antikörperlösung + 50 μl Probenlösung) gefüllt und 20 Minuten bei 1 mA/Gel und ca. 60 Minuten bei 5 mA/Gel getrennt.

Die Gele wurden den Gelröhrchen entnommen, 20 Minuten mit Trichloressigsäure (12,5 g ad 100 ml Aqua dest.) fixiert und 65 Minuten bei 40°C mit Comassie-Brilliant-Blue (0,2 g ad 100 ml Entfärbelösung) gefärbt. Die Entfärbung mit der Entfärbelösung (100 ml Eisessig + 500 ml Methanol + 1000 ml Aqua dest.) erfolgte über 2 Tage.

12. Mikrocytotoxizitätstest

Der komplementabhängige Mikrocytotoxizitätstest (Amos et al., 1969; Klein et al., 1974) wurde zum Nachweis der Cytotoxizität des monoklonalen Antikörpers 14 ACl verwendet.

Als Komplementquelle wurden Kaninchenserum benutzt, die ein stärkeres Komplement besitzen als Meerschweinenserum, aber auch stärker cytotoxisch sind. Deshalb mußte in Vorversuchen ein geeignetes Komplement ermittelt werden, um die falsch positiven wie auch die falsch negativen Ergebnisse auf ein Minimum zu reduzieren. Zur Prüfung des Komplements wurde Serum von BALB/c-Mäusen, die gegen das Gliom 79FR-G-41 immunisiert worden waren, in Verdünnungsstufen bis 1:10³ herangezogen. In den Vortests wurde die Cytotoxizität der 1:3 verdünnten Kaninchenserum mit und ohne Antikörperzusatz geprüft. Das Serum wurde als Komplementquelle für weitere Versuche verwendet, welches ohne Antikörperzusatz die geringste spontane Cytotoxizität, aber zusammen mit dem Antiserum (1:10² verdünnt) den höchsten cytotoxischen Index erbrachte.

Zur Durchführung des Mikrocytotoxizitätstestes wurden Rattengliom- bzw. Rattenhirnzellen mechanisch vom Kulturgefäß abgelöst, 5 Minuten bei 1000 rpm zentrifugiert und in frischem Medium resuspendiert, wobei die Zellzahl auf 5 x 10⁵ Zellen/ml Medium eingestellt wurde. Mit einer Hamiltonspritze mit Dispensiereinrichtung wurden jeweils 2 µl dieser Zellsuspension (1000 Zellen) in eine Vertiefung einer Terasaki-Mikrotestplatte (Nunc^(R)) transferiert, pro Vertiefung 2 µl Antikörper zugegeben und 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Als Antikörper wurde in den Vortests polyklonales Antiserum in Verdünnungsstufen von 1:1 bis 1:10³ verwendet. Zum Prüfen der Cytotoxizität des monoklonalen Antikörpers

wurde Ascitesflüssigkeit von BALB/c-Mäusen, denen der Hybridomklon 14 AC1 intraperitoneal transplantiert worden war, in Verdünnungsstufen von 1:1 bis 1:10³ verwendet. Die Proben wurden vor Verwendung 30 Minuten in einem 56°C warmen Wasserbad inaktiviert, um deren Komplementfaktoren auszuschalten. Nach der Inkubation mit Antikörper wurde ein Tropfen Medium (ca. 25 µl) in jede Vertiefung gegeben und nach 10 Minuten dekantiert. Danach wurden in jede Vertiefung 2 µl Komplement pipettiert und 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Nach einer abschließenden Inkubation von 5 Minuten bei 4°C wurden in jede Vertiefung 20 µl einer 6%igen Formalinlösung (gelöst in 0,9% NaCl) gegeben und die gesamte Platte mit einem Deckglas eingeschlossen. Die Auswertung des Tests erfolgte mittels eines umgedrehten Phasenkontrastmikroskops. Es wurden 150 Zellen pro Vertiefung ausgezählt und der Prozentsatz der lebenden berechnet. Lebende Zellen waren hell, dreidimensional und hatten einen hellen Hof, tote dagegen dunkel, zweidimensional und ohne Hof, außerdem war bei ihnen im Gegensatz zu den lebenden der Kern zu erkennen.

Als Spezifitätskontrolle dienten Hirnzellen neugeborener Fischer-Ratten, die nach der 2. in vitro-Passage verwendet wurden. Die Hirnzellen wurden ebenfalls mit monoklonalem Antikörper und Komplement inkubiert.

13. ⁵¹Cr-Release-Test

Zur Markierung der Targetzellen mit ⁵¹Cr wurden 2 x 10⁶ Gliomzellen (79FR-G-41) in 100 µl Nährmedium zu 100 µCi Na⁵¹CrO₄ (Amersham International PLC, Amersham UK) in NaCl gegeben. Die Zellen wurden unter leichtem Schütteln 1 Stunde bei 37°C und 5% CO₂ bebrütet (Reddy et al., 1984). Nach der Inkubation wurden die Zellen 3 mal mit Medium gewaschen und danach gezählt. Die Zellzahl wurde auf 5 x 10⁴ Zellen/ml Medium eingestellt. Von dieser Suspension wurden in eine (96)-Mikrotestplatte pro Vertiefung 100 µl gegeben und mit Antikörper in Verdünnungsstufen 1:1, 1:2, 1:4 und 1:8

2 Stunden inkubiert. Als Antikörper diente präzipitierte Ascitesflüssigkeit des Hybridomklons 14 AC1 (1 mg Antikörper/ml PBS-A). Nach 30, 60 und 120 Minuten wurden vorsichtig 100 µl Überstand entnommen und im Szintillationszähler die Anzahl der "Counts per minute" (cpm) bestimmt. Die Auswertung erfolgte durch Berechnung der speziellen Lysis der Targetzellen, die sich nach der Formel

$$\% \text{ spezielle Lysis} = \frac{\text{Testrelease} - \text{Spontanrelease}}{\text{Maximalrelease} - \text{Spontanrelease}} \times 100$$

errechnet, wobei "Testrelease" die gemessenen cpm bei Antikörperbebrütung, "Spontanrelease" die cpm ohne Antikörperzusatz und "Maximalrelease" die cpm, die durch Lysis der Targetzellen durch Tween 20 (Sigma P1379) frei wurden, darstellen.

14.Veränderungen der Tumorzellen unter Antikörpereinfluß in vitro

Die strukturellen Veränderungen unter Einwirkung des monoklonalen Antikörpers 14 AC1 wurde an den Gliomzellen 79FR-G-41 untersucht. In Leighton-tubes wurden 5×10^5 Zellen ausgesät und mit Nährmedium 24 Stunden im geschlossenen System bei 37°C bebrütet. Danach wurden die Zellen 3 mal mit PBS-A gewaschen und 2 Stunden bei 37°C mit Antikörper inkubiert (140 µg Antikörper/100 ml PBS-A + 2,5% FKS). Als Antikörper diente über Protein-A-Säule gereinigte Ascitesflüssigkeit des Hybridomklons 14 AC1. Die Kontrollzellen wurden mit PBS-A + 2,5% FKS bebrütet. Nach der Inkubation wurden die Zellen 3 mal mit PBS-A gewaschen und mit einer 1%igen Glutaraldehydlösung in PBS-A fixiert. Danach erfolgte eine Dehydratation in einer Äthanol-Isoamylacetatlösung aufsteigender Konzentration mit anschließender CO₂-Trocknung. Abschließend wurden die Zellen mit Gold in einer Dicke von 30 nm beschichtet. Die Untersuchung der Zelloberfläche wurde mittels eines Cambridge S 4-10 Scanning Rasterfeld Emissions-Elektronenmikroskopes (SEM) durchgeführt.

15. Tumorwachstumsdepression in vitro

Die Zellen der nicht synchronisierten Gliomlinien 79FR-G-41, 78FR-G-219, 78FR-G-284 und 78FR-G-299 wurden von den Kulturgefäßen abtrypsiniert, bei 1000 rpm 5 Minuten zentrifugiert und mit frischem Nährmedium resuspendiert, wobei die Zellzahl auf 1×10^6 Zellen/ml Medium eingestellt wurde. Von diesen Zellsuspensionen wurden 0,1 ml in 50 ml-Plastikflaschen (Nunc^(R)) gegeben, mit 5 ml antikörperhaltigem Medium (30 µg Antikörper/ml Medium) aufgefüllt und bei 37°C im geschlossenen System bebrütet. Als Antikörper wurde über Protein-A-Säule gereinigte, hitzeinaktivierte Ascitesflüssigkeit des Klon 14 ACl verwendet. Dadurch war eine Einwirkung von Komplement auszuschließen. Als Kontrollen dienten Gliomzellen, die mit derselben Menge einer unspezifischen Maus-IgG-Lösung bebrütet wurden (Dippold et al., 1984). Nach 48 Stunden wurden die Zellen abtrypsiniert und gezählt. Das Nährmedium, das frei schwimmende Zellen enthielt, wurde 5 Minuten bei 1000 rpm zentrifugiert und die darin enthaltenen Zellen ebenfalls gezählt.

Die Zelldichte wurde als Prozentsatz der mit monoklonalem Antikörper behandelten Zellen zu den Kontrollzellen ausgedrückt.

16. Markierung der Antikörper mit ^{131}Jod *

Zur Markierung der gereinigten Antikörper wurde die Chloramin-T-Methode (Greenwood et al., 1963) wie folgt verwendet: zu 40 µg 14 ACl-Antikörper (70 µl in PBS-A) wurden 20 µl Na^{131}J (2 mCi/50 µl, Amersham International PLC, Amersham UK) und 20 µl Chloramin-T (5 mg/ml Aqua dest., Merck 2426) gegeben. Nach einer Inkubationszeit von einer Minute bei Raumtemperatur wurde die Reaktion durch Zugabe von 170 µl Natriumdisulfit (279 mg/ml Aqua dest., Merck 6528) gestoppt. Danach wurden 20 µl Kaliumjodid (10 mg/ml Aqua dest., Riedel de Haen, Seelze, 30315) zugegeben und das markierte Protein vom

* Die radiologischen Untersuchungen wurden in Zusammenarbeit mit Frau Dr. R. Senekowitsch, Abt. für Nuklearbiologie (Prof. Dr. H. Kriegel), GSF, München, durchgeführt.

freien Jod über eine Sephadex-G-25 Sepharose-Säule (Pharmacia, 17-0032-01) getrennt. Zur Elution wurde PBS-A + 0,5% BSA verwendet. Es wurden Fraktionen zu je 10 Tropfen (ca 0,5 ml) gesammelt und die Radioaktivität im Szintillationszähler (Gammaszint BF5300, Berthold) gemessen.

17.Externe Szintigraphie

Zur Darstellung chemisch induzierter Rattengliome in vivo mittels radioaktiv markierter monoklonaler Antikörper wurden 6-8 Wochen alten männlichen BALB/c-nu/nu-Mäusen 4×10^6 79FR-G-41_{c7}-Zellen intramuskulär in den linken Oberschenkel transplantiert. 10 Tage nach der Transplantation (Tumorgroße ca. 1 cm^3) wurden 10-15 μg des ^{131}J -markierten monoklonalen Antikörpers 14 ACl in PBS-A mit einer Aktivität von 15-150 μCi (0,56-5,6 MBq) intravenös verabreicht. Um die Spezifität der Anreicherung der monoklonalen Antikörper im Tumor zu überprüfen, wurden den Kontrolltieren, denen ebenfalls 10 Tage zuvor 4×10^6 Gliomzellen intramuskulär transplantiert worden waren, ^{131}J -markiertes unspezifisches Maus-IgG intravenös appliziert. Die Schilddrüsen der Mäuse wurden während des Versuches nicht blockiert.

Für die externe Szintigraphie wurde eine Gammakamera mit einem 2 mm Pinhole-Collimator (Phillips) verwendet. Die Aufnahmen wurden sofort nach der Injektion des radioaktiv markierten Antikörpers sowie in 24 Stunden-Intervallen bis zu 96 Stunden gemacht. Die Energieeinstellung der Kamera erfolgte auf den 365 keV-peak der ^{131}J -Gammakamera bei einem Fenster von 20%. Zur Aufnahme wurden die Mäuse durch eine intraperitoneale Injektion von 0,1 ml Ketanest^(R) (100 mg/ml 0,9% NaCl-Lösung, Parke-Davis) und 0,1 ml Rompun^(R) (5 mg/ml 0,9% NaCl-Lösung, Bayer) narkotisiert. Die auflaufenden "counts" wurden 15 Minuten lang gezählt (10.000 - 20.000 counts) und die Daten in einem Digital Computer System mit einer 64 x 64 Matrix zur Auswertung gespeichert.

18. Verteilung des ^{131}J -14 ACl-Antikörpers in vivo

Nach der letzten Aufnahme mit der Gammakamera (96 Stunden nach der Injektion des radioaktiv markierten Antikörpers) wurden die Tiere durch Äther narkotisiert und sofort entblutet. Das Gewicht der Mäuse wurde bestimmt, danach wurden Tumor, Schilddrüse, Milz, Leber, Nieren, Femur, Gehirn und ein Muskelstück entnommen und gewogen. Das Gesamtblutvolumen wurde als Anteil von 7,5% des Körpergewichtes errechnet. Die "counts per minute" (cpm) der einzelnen Gewebe und des Blutes wurden im Szintillationszähler (Gamaszint BF5300, Berthold) gemessen und nach Verfallskorrektur die Gewebeaktivitäten als Prozentsatz der verabreichten Dosis/g Gewebe oder Prozentsatz der verabreichten Dosis/Gesamtorgan ausgedrückt. Außerdem wurde das Verhältnis Prozentsatz der verabreichten Dosis pro g Gewebe/Prozentsatz der verabreichten Dosis pro g Blut errechnet.

II. ERGEBNISSE

1. Klonierung der Hybridome

Zur Steigerung und Erhaltung der Antikörperproduktion wurden die Hybridome rekloniert, um nicht produzierende Varianten zu eliminieren. Für jede Kolonie wurde die Anzahl der positiven zur Anzahl der getesteten Proben mit Hilfe des mikro-ELISA ermittelt. Dabei wurden solche Subklone als positiv bewertet, deren Überstand beim Test eine Absorption von mindestens 0,100 erreichten. Die durchschnittlichen Klonierungsausbeuten sind in Tabelle 1 dargestellt.

Tabelle 1 Klonierungsergebnisse der Hybridome aus
Fusion 13 und 14, dargestellt als Quotient
Anzahl der positiven Vertiefungen
Anzahl der getesteten Vertiefungen

Klon	Quotient
13 GC1	60/96
14 AC1	72/96
14 BC1	66/96
14 KC1	60/96
14 LC1	70/96
14 ZC1	68/96

2. Indirekte Immunperoxidasefärbung

Zur Darstellung der Antigen-Antikörperbindung wurde eine indirekte Immunperoxidasefärbung der Gliomzellen in Terasakiplatten (Nexo et al., 1977) durchgeführt. Als Antikörper wurden Kulturüberstände von Hybridomklonen verwendet, die nach der Reklonierung ihre Antikörperproduktion beibehalten hatten. Die Absorption der Kulturüberstände beim mikro-ELISA lag zwischen 0,100 und 2,000. Diese Subklone zeigten auch bei der indirekten Immunperoxidasefärbung eine positive bis stark positive Farbreaktion.

Die Verteilung der Antigen-Antikörperkomplexe auf der Zelloberfläche war unterschiedlich. Bei manchen Zellen war die gesamte Membran wie auch die Membran der Zellfortsätze angefärbt (Abb. 4 a). Bei anderen Zellen waren die Komplexe nur an einzelnen Stellen der Zelloberfläche zu sehen (Abb. 4 b). Ein kleiner Teil der Targetzellen (ca. 5%) zeigte keine Bindung des Antikörpers an die Zelloberfläche (Abb. 4 c).

3. Immunodiffusion und SDS-Gelelektrophorese

Die serumfreien Hybridomüberstände der Klone 13 GCl, 14 AC1, 14 BC1, 14 KC1, 14 LC1 und 14 ZC1 wurden durch Ammoniumulfatpräzipitation zehnfach konzentriert und die Immunglobulin-klassen mittels Agargelimmunodiffusion nach Ouchterlony et al. (1962) untersucht. Der Test erbrachte Präzipitationslinien, die bei dem Klon 13 GCl auf die Anwesenheit von IgG₁, bei allen anderen Klonen auf IgG_{2a} schließen lassen (Abb. 1, Tab. 2).

Die Reinheit der Hybridomprodukte wurde mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese untersucht. Die Gelelektrophorese ergab charakteristische Banden, die bei allen Proben auf die Anwesenheit einer schweren (γ) und einer leichten (K) Kette schließen lassen. Andere Banden oder Verunreinigungen waren nicht festzustellen (Abb. 1).

Tab.2 Zusammenfassende Darstellung der Ergebnisse der
Agargelimmunodiffusion und SDS-PAGE

Hybridomklon	Immunglobulin	Ketten
--------------	---------------	--------

13 GC1	G ₁	Y + K
14 AC1	G _{2a}	Y + K
14 BC1	G _{2a}	Y + K
14 KC1	G _{2a}	Y + K
14 LC1	G _{2a}	Y + K
14 ZC1	G _{2a}	Y + K

4.Ascitesproduktion

Zur Erzielung höherer Antikörperkonzentrationen wurden die Hybridome in vivo transplantiert. Lebende Zellen gut wachsender Subklone wurden in die Bauchhöhle von adulten BALB/c-Mäusen gespritzt. Um die Implantation der Zellen zu erleichtern, wurde drei Wochen zuvor Pristane^(R) intraperitoneal injiziert. 10 Tage nach der Hybridomtransplantation konnten 6-10 ml Ascitesflüssigkeit mit einer durchschnittlichen Zellzahl von 10^8 Zellen/ml gewonnen werden. Nach dem Abzentrifugieren der Zellen verblieb ein Rest von 4-8 ml. Der Antikörpertiter der zellfreien Ascitesflüssigkeit wurde im mikro-ELISA bestimmt. Dabei waren Titer bis zu 1:128.000 festzustellen (Tab. 3). In der Bauchhöhle der ascitesproduzierenden Tiere zeigten sich multiple solide Tumoren.

Ein Teil der Tiere bildete keinen Ascites und bei diesen konnten auch 4 Wochen nach der Transplantation durch Spülung der Bauchhöhle mit PBS-A keine Hybridome gewonnen werden. Es waren auch keine soliden Tumoren in der Bauchhöhle zu sehen. Zur Gewinnung einer Ascitesflüssigkeit ohne spezifischen Antikörper für Kontrollexperimente wurden anstelle der Hybridome Myelomzellen (X63-Ag8.653) intraperitoneal transplantiert. Auch hier war nicht bei allen Tieren Ascitesflüssigkeit zu gewinnen.

Tab.3 Ascitesgewinnung nach intraperitonealer Transplantation von Hybridomen bzw. Myelomzellen bei Pristane^(R)-vorbehandelten BALB/c-Mäusen

Klon	Anzahl der Mäuse	Ascites- bildung	durchschnitt- liche Menge	Zellzahl pro ml	Titer
13 GC1	5	3	10 ml	10 ⁸	1:128000
14 AC1	25	21	8 ml	10 ⁸	1:128000
14 BC1	3	2	6 ml	10 ⁸	1: 64000
14 KC1	3	3	7 ml	10 ⁸	1: 64000
14 LC1	3	2	8 ml	10 ⁸	1:128000
14 ZC1	3	1	7 ml	10 ⁸	1: 32000
X63-Ag8. 653	15	13	7 ml	10 ⁸	- -

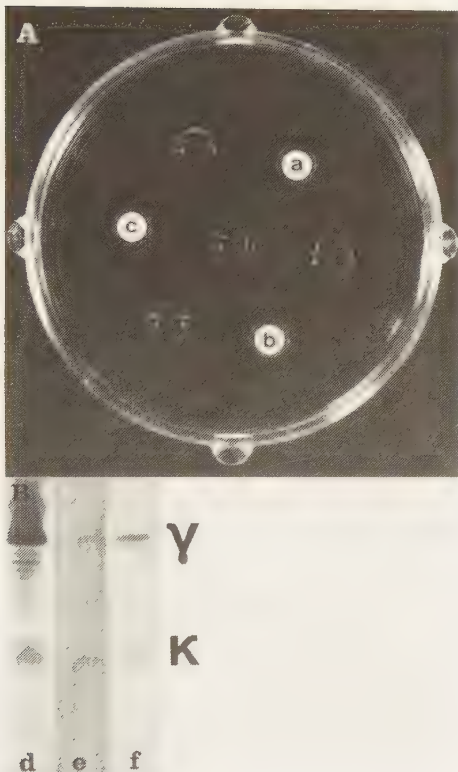


Abb. 1: (A) Immunodiffusionstest: Im zentralen Loch befindet sich zehnfach konzentrierter 14 AC1-Überstand, in Loch (a) Anti-Maus-IgG_{2a}, (b) Anti-Maus-IgG_{2b} und (c) Anti-Maus-IgG₁.

Zwischen dem zentralen Loch und (a) ist eine deutliche Präzipitationslinie zu erkennen.

(B) SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese:

(d) präzipitierte Ascitesflüssigkeit
(e) serumfreier Überstand und
(f) über Protein-A-Säule gereinigte

Ascitesflüssigkeit des Klons 14 AC1.

Es sind deutliche Banden zu erkennen, die eine schwere (γ) und eine leichte (K) Kette darstellen.

5. Reinigung der Immunglobuline

Die durch Ammoniumsulfatpräzipitation gewonnene Immunglobulinfraktion der Ascitesflüssigkeit enthielt noch mehrere unspezifische Proteine (Abb. 1 d). Zur Isolierung des gliomspezifischen IgG₂ des Hybridomklons 14 AC1, wurden die Proben über eine Protein-A-Sepharose-Säule gereinigt. Um eine Verunreinigung des Antikörpers mit unspezifischem Maus-IgG₁ zu vermeiden, wurde nach Auftragen der Probe erst mit Citratpuffer pH 6 eluiert (Ey et al., 1978). Zur Elution des spezifischen IgG₂ wurde Glycin/HCl pH 2,8 verwendet. Durch photometrische Messung der Fraktionen bei A₂₈₀ war bei der Elution mit Glycin/HCl ein deutlich größerer Peak (Fraktionen 11-15) als bei der Elution mit Citratpuffer (Fraktionen 1-4) festzustellen (Abb. 2).

6. Mikrocytotoxizitätstest

Hitzeinaktivierte Ascitesflüssigkeit von BALB/c-Mäusen, denen der Hybridomklon 14 AC1 intraperitoneal transplantiert worden war, wurde auf seine komplementabhängige Cytotoxizität gegen die Gliomzelllinien 79FR-G-41, 78FR-G-219, 78FR-G-284 und 78FR-G-299 getestet. Die Spezifität des Antikörpers wurde mit normalen Hirnzellen neugeborener Ratten geprüft. Die cytotoxische Wirkung wurde als cytotoxischer Index (I_C) nach der Formel

$$I_C = 1 - \frac{\% \text{ lebende Zellen mit 14 AC1-Antikörper}}{\% \text{ lebende Zellen Kontrolle}}$$

berechnet (Wood et al., 1970).

Es war eine deutliche Cytotoxizität des monoklonalen Antikörpers 14 AC1 bis zu einer Ascitesverdünnung von 1 : 10³ zu sehen.

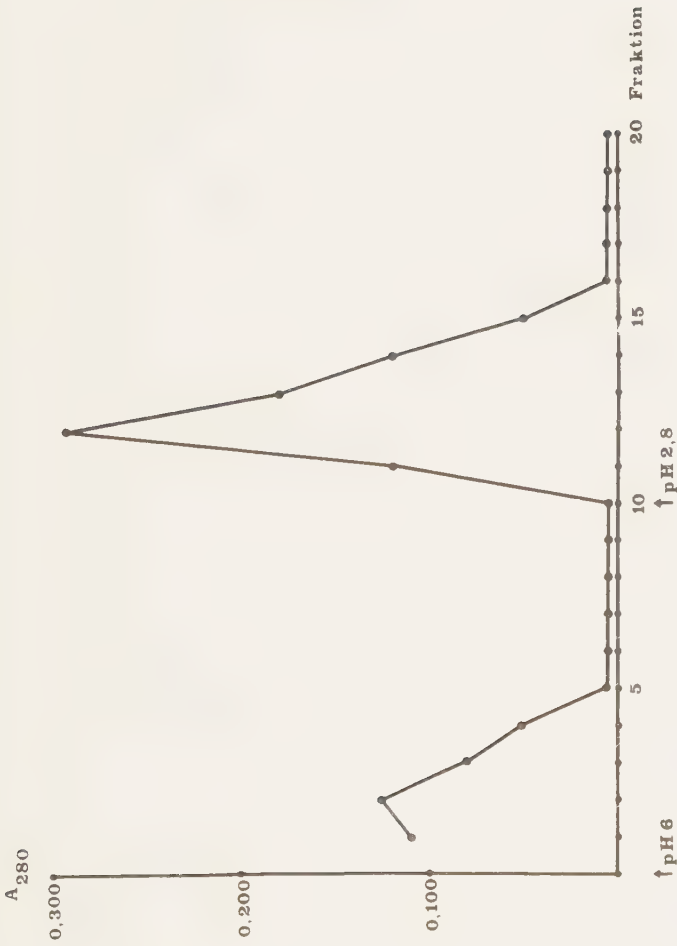


Abb. 2: Reinigung und Isolierung des monoklonalen Antikörpers 14 AC1 (IgG₂)
aus Ascitesflüssigkeit mittels Protein-A-Sepharose-Säule:
Elution mit Citratpuffer (pH 6) und Glycin/HCl-Puffer (pH 2,8)

Der 14 AC1-Antikörper zeigte Kreuzreaktionen mit allen verwendeten Gliomzelllinien, während bei normalen Rattenhirnzellen keine cytotoxische Reaktion festzustellen war (Abb 3).

Die natürliche Cytotoxizität des Komplements betrug bei Gliomzellen 4-8%, bei Hirnzellen 1%.

Tab 4: Komplementtestung, ausgedrückt als I_C

Kaninchen- Verdünnung ohne Antiserum			79FR-G-41-Antiserum			
serum			1:1	1:10	1:100	1:1000
1	1:3	0,08	1,00	1,00	0,62	0,35
2	1:3	0,06	1,00	1,00	0,38	0,10
3	1:3	0,18	1,00	1,00	0,75	0,35
4	1:3	0,04	1,00	1,00	0,72	0,25
5	1:3	0,03	1,00	0,97	0,15	0,08
6	1:3	0,16	1,00	1,00	0,76	0,41
7	1:3	0,07	1,00	0,88	0,53	0,12
8	1:3	0,12	1,00	1,00	0,58	0,29



Abb. 3: MCT: Cytotoxische Aktivität des monoklonalen Antikörpers 14 AC1 auf Gliomzellen (● 79FR-G-41, ■ 78FR-G-219, □ 78FR-G-284, ○ 78FR-G-299) und Gliazellen (Δ).

7. Wachstumsdepression in vitro

Das Wachstum der Rattengliomzellen 79FR-G-41, 78FR-G-219, 78FR-G-284 und 78FR-G-299 wurde unter Einwirkung des monoklonalen Antikörpers 14 AC1 untersucht. Die Zellen wurden in 50 ml Plastikflaschen (Nunc^(R)) ausgesät und bei 37°C mit Nährmedium bebrütet, welches 30 µg Antikörper/ml enthielt. Die Zellen wurden 48 Stunden im geschlossenen System bebrütet. Danach wurde die Zahl der Zellen sowohl am Kulturgefäßboden als auch im Überstand bestimmt. Als Kontrolle dienten Gliomzellen, die mit derselben Menge unspezifischem Maus-IgG bebrütet worden waren. Die Wachstumsdepression der Gliomzellen wurde als Quotient nach der Formel

$$Q = \frac{\text{Zellzahl unter 14 AC1-Einwirkung}}{\text{Zellzahl Kontrolle}} \times 100$$

berechnet.

Nach 48 Stunden war eine deutliche Verminderung der Zellzahl gegenüber der Kontrolle zu beobachten. (Tab. 5).

Der Antikörper 14 AC1 hatte auf alle getesteten Gliomlinien einen cytostatischen Effekt.

Um zu verifizieren, daß innerhalb der ersten Stunden der Antikörperinkubation keine Cytolyse stattfand, wurde die

⁵¹Cr-Freisetzung von markierten Gliomzellen (79FR-G-41) untersucht. Bei einer Antikörperkonzentration bis zu 500 µg/ml Medium konnte innerhalb von 2 Stunden keine spezifische ⁵¹Cr-Freisetzung beobachtet werden (Tab. 7) .

Durch die Verwendung von Immunglobulinfraktionen hitzeinaktivierter 14 AC1-Ascitesflüssigkeit, die über eine Protein-A-Sepharosesäule gereinigt worden war, konnte die Einwirkung von Komplement ausgeschlossen werden. Der Maximalwert der speziellen Lysis betrug 8,36%, was nicht auf eine Antikörper-einwirkung, sondern auf eine unspezifische Freisetzung von ⁵¹Cr durch Zelltod während des Tests zurückzuführen ist.

Bei den Gliomzellen war unter Antikörpereinwirkung eine Veränderung im Verhalten der Gliomzellen festzustellen. 48 Stunden nach Antikörperzugabe waren die meisten Gliomzellen abgerundet und ein großer Teil hatte sich vom Kulturgefäßboden abgelöst (Tab. 6). Die morphologischen Veränderungen der Zellen wurden im Scanning Rasterfeld Emissions-Elektronenmikroskop genauer untersucht.

Um festzustellen, ob die abgelösten Zellen abgestorben waren, wurden sie vom Überstand bei 1000 rpm 5 Minuten abzentrifugiert, mit PBS-A gewaschen und mit antikörperfreiem Nährmedium neu ausgesät. Nach 24 Stunden hatten sich die Zellen abgesetzt, Fortsätze gebildet und das Wachstum neu begonnen. Die strukturellen Veränderungen konnten jedoch nicht bei allen Zellen beobachtet werden. Ein Teil von ihnen behielt auch unter Antikörpereinwirkung seine Zellfortsätze und setzte sein Wachstum fort (Abb. 4 d).

Durch viermalige Antikörperbehandlung konnten so Zelllinien gewonnen werden (79FR-G-41-N, 78FR-G-219-N, 78FR-G-284-N, 78FR-G-299-N), bei denen weder durch Antikörperinkubation noch in der indirekten Immunperoxidasefärbung eine Antigen-Antikörperbindungsreaktion festzustellen war (Abb. 4 c, Tab. 5).

Diese antikörperresistenten Klone behielten ihre phänotypische Stabilität auch nach 15 in vitro-Passagen.

Tab. 5: Behandlung von Gliomzellen mit 14 AC1-Antikörper
in vitro, dargestellt als Quotient
(Q) nach mehrmaliger Antikörperbehandlung

Gliomlinie	Antikörperbehandlung			
	1.	2.	3.	4.

79FR-G-41	28	35	76	100
78FR-G-219	36	42	100	100
78FR-G-284	58	64	100	100
78FR-G-299	42	58	100	100

Tab. 6: Verteilung der Gliomzellen zwischen Kulturgefäßboden
und Kulturüberstand (in %) nach mehrmaliger
14 AC1-Antikörperbehandlung

Gliomlinie	Antikörperbehandlung			
	1.	2.	3.	4.

79FR-G-41	63/37	72/28	84/16	100/0
78FR-G-219	68/32	85/15	100/0	100/0
78FR-G-284	84/16	91/9	100/0	100/0
78FR-G-299	72/28	84/16	100/0	100/0

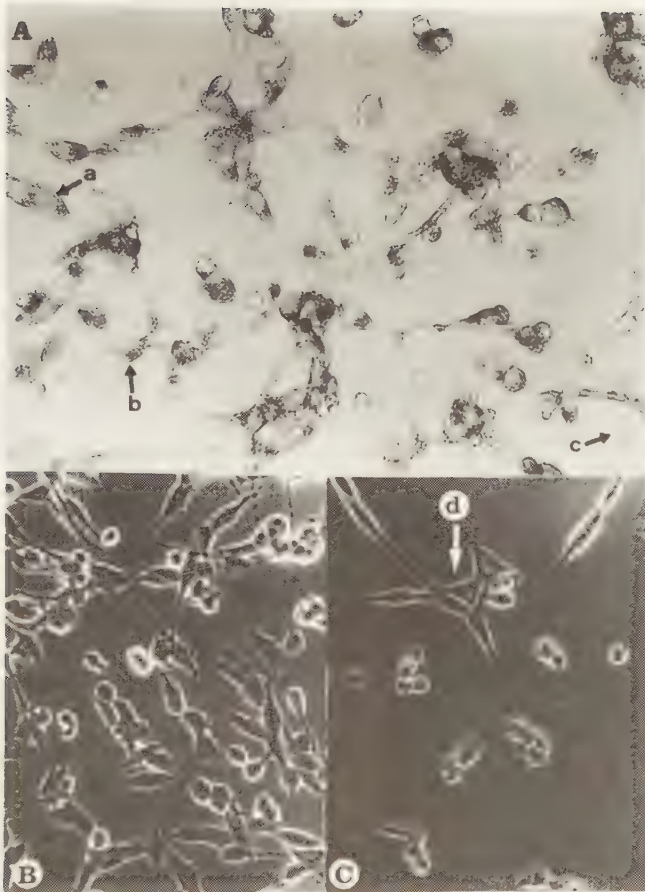


Abb. 4: (A) IPF: Die Zellen der Gliomlinie 79FR-G-41 binden den Antikörper unterschiedlich an der Zelloberfläche: (a) vollständige Färbung der gesamten Zellmembran, (b) nur teilweise Färbung und (c) keine Färbung.

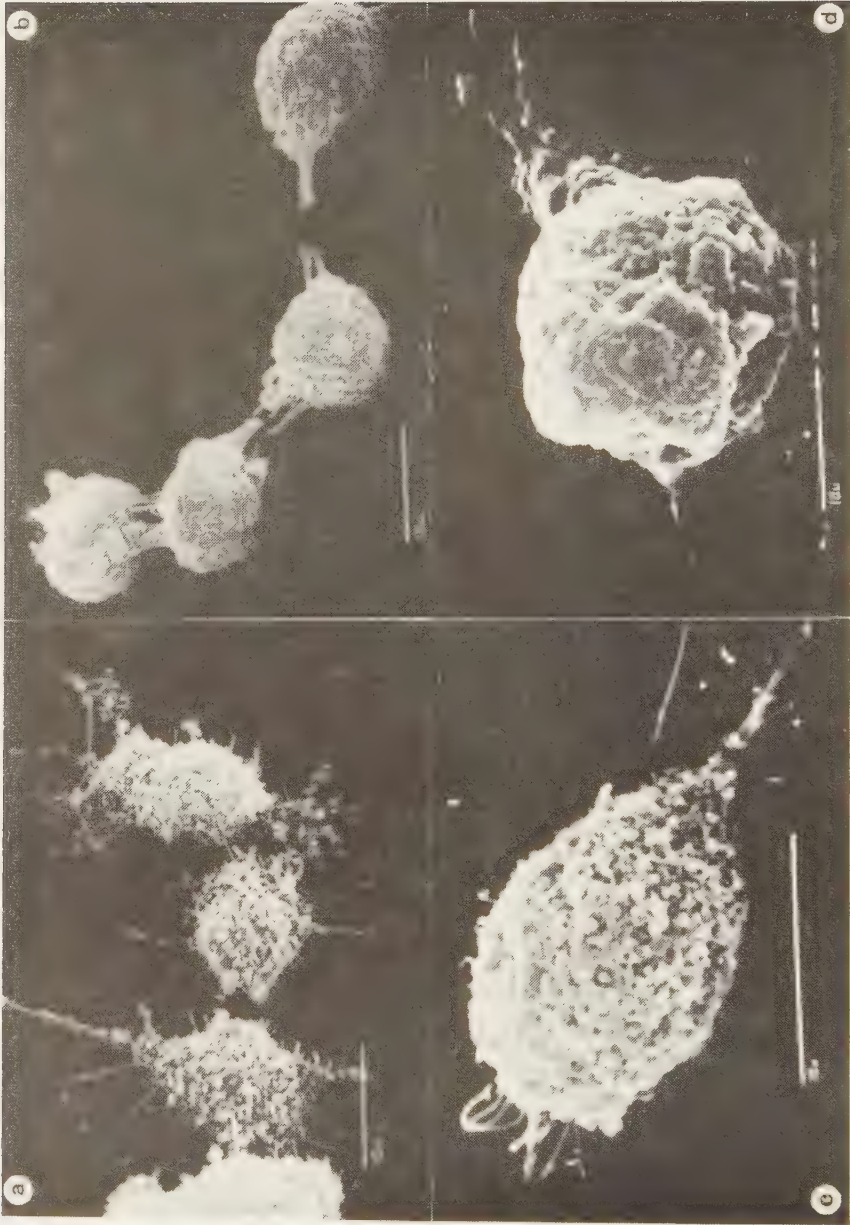
(B) + (C): Wachstumsdepression in vitro: Deutlich geringere Zellzahl und veränderte Zelloberflächen unter Einwirkung des Antikörpers 14 AC1 (C) im Vergleich zur Kontrolle (B). Ein Teil der Zellen (d) zeigt keine morphologischen Veränderungen unter Antikörpereinwirkung (A, B, C, 200x).

Tab. 7: ^{51}Cr -Release-Test: Wirkung des monoklonalen
Antikörpers 14 AC1 auf 79FR-G-41 Gliomzellen in vitro,
dargestellt als % spezielle Lysis

Inkubationszeit	Antikörperverdünnung			
	1:1	1:2	1:4	1:8
30 min	6,20	8,36	4,60	7,10
60 min	5,94	2,02	8,12	2,70
120 min	1,84	1,86	1,31	5,26

8. Rasterelektronenmikroskopische Befunde an den Gliomzellen
nach der Einwirkung des monoklonalen Antikörpers 14 AC1

Die Bindung des monoklonalen Antikörpers 14 AC1 an die Zellen der Gliomlinie 79FR-G-41 führte zu Veränderungen der Zelloberflächen, die im SEM sichtbar gemacht werden konnten (Abb. 5). An den Zellen war eine blumenkohlartige Raffung der Zellmembran und eine deutliche Abnahme und Verkleinerung der Mikrovilli zu erkennen. Die interzellulären Junctionen bildeten sich größtenteils zurück. Der Hauptanteil der Zellen rundete sich ab und bildete seine Fortsätze zurück. Befunde, die auf eine Zellzerstörung durch Bildung von antikörperbedingten Membranschäden, wie Einbuchtungen, Löcher etc., hinwiesen, waren jedoch nicht zu erkennen. Der Antikörper verursachte jedoch eine Agglutination und ein Verklumpen ("Clotting") der Oberflächenstruktur der Targetzellen. Dies führte, wie im Phasenkontrastmikroskop zu sehen war, zu einem Ablösen eines Großteils der Zellen vom Kulturgefäßboden. Eine Einwirkung von Komplement war auszuschließen, da der Antikörper hitzeinaktiviert und über eine Protein-A-Sepharose-Säule gereinigt worden war.



b. 5: Morphologische Veränderungen der Gliomzellen 79FR-G-41 unter Einwirkung des monoklonalen Antikörpers 14 AC1: (a)+(c) ohne Antikörperzusatz, (b)+(d) mit Antikörper. Es ist eine deutliche Raffung der Zellmembran und ein Verlust der Mikrovilli zu erkennen. (a+b x 2300, c+d x 5000)

9. Externe Szintigraphie und Verteilung des ^{131}J -14 AC1-Antikörpers in vivo

Die Scanning-Aufnahmen mit der Gammakamera zeigten eine deutliche Akkumulation des radioaktiv markierten monoklonalen Antikörpers 14 AC1 in dem intramuskulär in BALB/c-nu/nu-Mäuse transplantierten Rattengliom 79FR-G-41_{c7}. Die Aufnahmen wurden sofort nach Injektion des Antikörpers sowie nach 24, 48 und 96 Stunden gemacht. Obwohl der Tumor schon nach 48 Stunden deutlich zu sehen war, nahm die Background-Aktivität erst nach 96 Stunden vollständig ab. 48 und 72 Stunden nach Injektion war noch eine erhöhte Aktivität im Abdomen, insbesondere in Leber, Nieren und Milz zu erkennen. Der Tumor zeichnete sich jedoch bei den Tieren, denen der spezifische monoklonale Antikörper injiziert worden war, ab 24 Stunden nach der Injektion besser ab als bei den Kontrolltieren, denen radioaktiv markiertes unspezifisches Maus-IgG verabreicht worden war. Sofort nach Injektion war eine Verteilung der Radioaktivität im gesamten Tierkörper zu erkennen, was auf einen reinen Durchblutungseffekt zurückzuführen ist. Hier waren keine Unterschiede zwischen dem spezifischen und dem unspezifischen Antikörper zu erkennen (Abb. 6 c, d).

Nach 24 Stunden war eine deutliche Akkumulation an Radioaktivität in der unblockierten Schilddrüse festzustellen, was auf eine Dejodierung des ^{131}J -14 AC1-Antikörpers schließen läßt, da der injizierte Antikörper kein freies Jod enthielt. 48 Stunden nach Injektion zeigte der spezifische Antikörper eine deutlich höhere Aufnahme in den Tumor als das unspezifische Maus-IgG.

72 Stunden nach Injektion hatte die Background-Aktivität deutlich abgenommen, während die Aktivität in der Schilddrüse unbeeinflusst blieb.

96 Stunden nach Injektion des spezifischen Antikörpers waren im Vergleich zur Kontrolle nur noch Tumor und Schilddrüse deutlich zu erkennen, der Tierkörper jedoch nicht mehr. Bei der Kontrolle fand keine spezifische Akkumulation der Radioaktivität im Tumor statt (Abb. 6 e, f).

Unter Verwendung eines Computers, der an die Gammakamera angeschlossen war, wurden die Zählraten ("Count ratios") definierter Gebiete von Tumor, Schilddrüse und Leber bestimmt und zu den verschiedenen Zeiten der Szintigraphieaufnahmen verglichen. Die Ergebnisse zeigten, daß nur der absinkende Blutspiegel der Radioaktivität zur Abnahme der Zählraten führte. Das Verhältnis der Zählraten zwischen den definierten Gebieten änderte sich zwischen 48 und 96 Stunden nur unwesentlich.

Die Verteilung des injizierten radioaktiv markierten Antikörpers wurde 96 Stunden nach Injektion durch Wiegen der einzelnen Gewebestücke und Organe sowie durch Messen ihrer Zählrate im Szintillationszähler (Gamaszint BF 5300, Berthold) untersucht. Zu dieser Zeit betrug die Blutaktivität 3,6% der verabreichten Dosis/g Blut oder 5,4% der verabreichten Dosis/Gesamtblut. Die höchste Aktivität wurde im Tumor der mit spezifischem monoklonalem Antikörper injizierten Mäuse gefunden (Tab. 8). Das Tumorgewicht reichte von 1,5 g bis 5,1 g, die mittlere Gesamtakkumulation der Radioaktivität war 11% (3,8%-19,2%) der verabreichten Dosis. Bei den mit radioaktiv markiertem, unspezifischen Maus-IgG injizierten Kontrollmäusen lag die mittlere Gesamtakkumulation im Tumor bei 0,51% (0,28%-0,78%) der applizierten Dosis. Auch das Verhältnis Prozentsatz der verabreichten Dosis pro g Tumor/ Prozentsatz der verabreichten Dosis pro g Blut war nach Injektion des monoklonalen Antikörpers deutlich höher als nach Injektion des Kontroll-IgG (Tab. 9). Die Antikörperbindung an normales Gewebe war gering. Nur die Schilddrüse zeigte eine sehr hohe Konzentration an Radioaktivität. Dies ist wahrscheinlich auf eine in vivo-Spaltung der ^{131}J -Antikörper-Bindung und dadurch Freisetzung von $^{131}\text{J}^-$, das in der Schilddrüse akkumulieren kann, zurückzuführen.

Die Aufnahme des monoklonalen Antikörpers 14 ACl in den Tumor wurde mit dem eines unspezifischen Maus-IgG verglichen, um die Spezifität des Antikörpers nachzuweisen. Die Akkumulation im Tumor war beim spezifischen Antikörper 10 mal höher als bei der Kontrolle (% der verabreichten Dosis/g). Auch das Gewebe/Blut-Verhältnis war deutlich (6 mal) höher als bei der

Kontrolle.

Bei der externen Szintigraphie stellte sich der Tumor bei den Kontrolltieren, wenn überhaupt, nur sehr schwach dar, was auf einen Durchblutungseffekt ohne spezifische Lokalisation zurückzuführen ist.

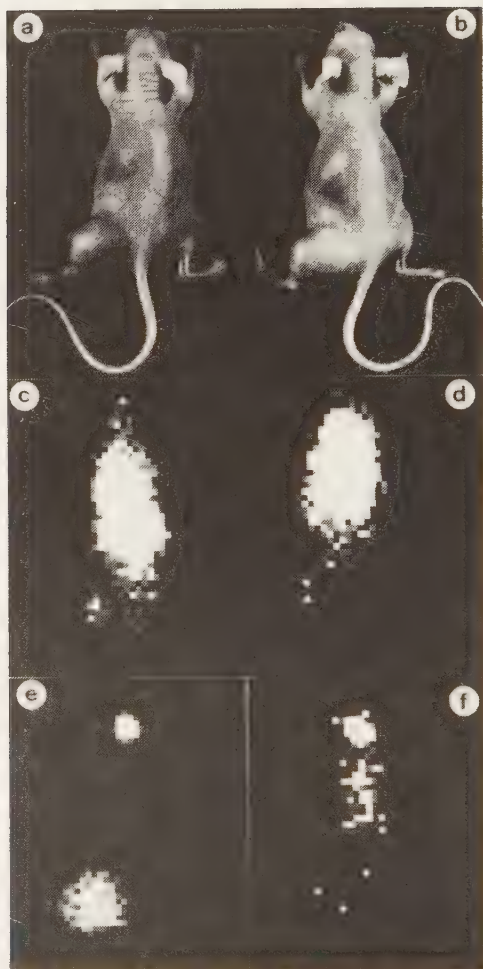


Abb. 6: Externe Szintigraphie: Darstellung eines i.m. in den linken Oberschenkel transplantierten Rattenglioms (79FR-G-41_{c7}) bei BALB/c-nu/nu-Mäusen (a+b) mittels radioaktiv markiertem Antikörper 14 ACl (c+e) bzw. unspezifischen Maus-IgG (d+f) als Kontrolle.
(c+d): sofort nach Injektion
(e+f): 96 Stunden nach Injektion
Der Tumor stellte sich 96 Stunden nach Injektion des monoklonalen Antikörpers im Gegensatz zum unspezifischen Maus-IgG deutlich dar. Hingegen ist 96 Stunden nach Injektion eine deutliche Akkumulation von freien $^{131}\text{I}^-$ in der Schilddrüse beider Tiere zu erkennen.

Tab. 8: Verteilung der Radioaktivität nach Injektion des radioaktiv markierten monoklonalen Antikörpers 14 AC1 bzw. des unspezifischen Maus-IgG in BALB/c-nu/nu-Mäusen mit i.m. transplantierten 79FR-G-41_{c7}-Gliomen 96 Stunden nach Injektion.

	¹³¹ J-14 AC1 N = 6		¹³¹ J-IgG N = 4	
	% Dosis/g	% Dosis/Organ	% Dosis/g	% Dosis/Organ
Tumor	3,65 (0,94-5,80)	11,0	0,31 (0,15-0,38)	0,51
Leber	1,10 (0,60-1,70)	2,50	0,38 (0,24-0,49)	0,57
Milz	1,02 (0,40-1,30)	0,25	0,35 (0,18-0,51)	0,035
Niere	1,10 (0,30-1,50)	0,21	0,41 (0,32-0,52)	0,18
Muskel	0,31 (0,07-0,60)	-	0,14 (0,14-0,17)	-
Femur	0,38 (0,26-0,47)	-	0,28 (0,28-0,29)	-
Gehirn	0,06 (0,03-0,10)	0,03	0,07 (0,05-0,10)	0,03
Blut	3,60 (1,02-5,60)	5,04	1,76 (0,50-2,40)	1,13
Schild- drüse	2014 (1600-2978)	3,80	3410 (3455-3632)	5,33

Tab. 9: Verteilung der Radioaktivität 96 Stunden nach Injektion des radioaktiv markierten monoklonalen Antikörpers 14 AC1 bzw. des unspezifischen Maus-IgG in BALB/c-nu/nu-Mäusen mit subcutan transplantierten 79FR-G-41_{c7}-Gliomen, ausgedrückt als Verhältnis Prozentsatz der verabreichten Dosis pro g Gewebe/ Prozentsatz der verabreichten Dosis pro g Blut.

	¹³¹ J-14 AC1	¹³¹ J-IgG
Tumor	1,01	0,17
Leber	0,30	0,21
Milz	0,28	0,19
Niere	0,30	0,23
Muskel	0,08	0,07
Femur	0,10	0,16
Gehirn	0,01	0,03

E. DISKUSSION

Die oben angeführten Untersuchungen zeigen, daß monoklonale Antikörper gegen chemisch induzierte Rattengliome spezifische Bindungseigenschaften besitzen. Darüber hinaus konnte festgestellt werden, daß die in vitro-Behandlung von Gliomzellen mit dem Gliomantikörper 14 AC1 zu einer ausgeprägten Proliferationsdepression führt.

Die Produkte der Hybridomklone wurden mittels Immunodiffusion und SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese charakterisiert. Dabei stellte sich heraus, daß der Klon 13 GC1 ein IgG₁ und alle anderen Klone ein IgG_{2a} mit jeweils einer schweren und einer leichten Kette produzieren. Da die zur Fusion verwendete Myelomlinie X63-Ag8.653 keine Immunglobuline sezerniert (Kearney et al., 1979), kann daraus gefolgert werden, daß die Immunglobulinketten von den Hybridomen stammen und gegen Zelloberflächenantigene der zur Immunisierung verwendeten Gliomlinie 79FR-G-41 gerichtet sind.

Die Bindungseigenschaften der monoklonalen Antikörper an die Targetzellen in vitro und in vivo hängt einmal von der Konzentration und der Avidität des Antikörpers sowie den antigenen Determinanten der Zellen ab. Die Variabilität der Antikörperkonzentration wurde dadurch auf ein Minimum beschränkt, daß zum einen die Überstände der Hybridomklone immer zum selben Zeitpunkt bei gleicher Zelldichte genommen, zum anderen für die meisten Versuche der Antikörper gereinigt und die Konzentration auf eine bestimmte Höhe eingestellt wurde. Bei gleicher Konzentration war die Avidität der verschiedenen Klonprodukte im mikro-ELISA nicht unterschiedlich. Die antigenen Determinanten waren jedoch, wie bei der indirekten Immunperoxidasefärbung zu sehen war, unterschiedlich verteilt, bei einem Teil der Zellen war keine Antigen-Antikörperreaktion festzustellen.

Die Expression der gliomassoziierten Antigene unter verschiedenen Bedingungen in vitro und in vivo wie auch die Stabilität bei der Fixierung wurden durch den mikro-ELISA, die

indirekte Immunperoxidasefärbung und die externe Szintigraphie untersucht.

Für den mikro-ELISA wurden lebende, unfixierte Zellen verwendet, wobei eine starke Antigen-Antikörperbindungsreaktion festzustellen war. Auch durch die Fixierung der Zellen mit Methanol-Aceton (1:1) für die indirekte Immunperoxidasefärbung wurden die Antigen determinanten nicht zerstört. Durch die externe Szintigraphie war eine in vivo-Bindung des 14 AC1-Antikörpers nachweisbar. Allerdings können aus den vorliegenden Befunden keine Angaben über die Verteilung des ^{131}J -14 AC1-Antikörpers im Tumorgewebe gemacht werden. Im Hinblick auf die mögliche Verwendung monoklonaler Antikörper in therapeutischer Absicht ist die Klärung dieser Frage von besonderem Interesse und muß weiteren autoradiographischen Untersuchungen vorbehalten bleiben.

Die Ergebnisse zeigen, daß unterschiedliche, chemisch induzierte Gliome der Ratte zum Teil identische tumorassoziierte Antigene exprimieren. So bewirkte der monoklonale Antikörper 14 AC1, der gegen Antigenstrukturen auf Zellen der Gliomlinie 79FR-G-41 gerichtet ist, auch bei den Gliomlinien 78FR-G-219, 78FR-G-284 und 78FR-G-299 eine komplementabhängige Cytotoxizität in vitro. Die Ascitesflüssigkeit hatte eine ähnliche cytotoxische Wirkung wie polyvalente Antiseren gegen andere chemisch induzierte neurogene Tumoren der Ratte (Fields et al., 1975; Stavrou et al., 1977) oder spontane neurogene Tumoren des Menschen (Coakham et al., 1974; Schnegg et al., 1981). Eine cytotoxische Wirkung auf normale Hirnzellen war nicht zu beobachten, ein Umstand, der auf eine hohe Spezifität des monoklonalen Antikörpers gegen gliomassoziierte Antigene hinweist.

In vitro waren auch ohne Beteiligung von Komplement Veränderungen sowohl im Verhalten, als auch an den Oberflächenstrukturen der Targetzellen unter Antikörpereinfluß festzustellen (Lederer et al., 1984). Ein Zelltod konnte jedoch nicht festgestellt werden. Die Zellen werden durch die Membranveränderungen in Anwesenheit des monoklonalen Antikörpers

möglicherweise in ihre G₀-Phase gebracht und in ihrem Stoffwechsel und Wachstum beeinträchtigt. Darauf deuten auch die Versuche zur Wachstumsdepression in vitro hin. Dippold et al. (1984) fanden eine ähnliche Wirkung von monoklonalen Antikörpern auf menschliche Melanomzellen in vitro ohne Einwirkung von Komplement. Sie konnten jedoch bei längerer Antikörper-einwirkung auch eine Cytotoxizität des Antikörpers feststellen. Die durch die indirekte Immunperoxidasefärbung sowie die Wachstumsdepression in vitro gewonnenen Ergebnisse deuten auf eine immunologische Heterogenität der chemisch induzierten Rattengliome hin. Durch "Immunselektion" mit dem monoklonalen Antikörper 14 AC1 konnten Zelllinien etabliert werden, die das Antigen, gegen das der Antikörper gerichtet ist, nicht mehr exprimieren. Eine Antigenexpression war bei diesen Zelllinien (79FR-G-41-N, 78FR-G-219-N, 78FR-G-284-N, 78FR-G-299-N) auch nach 15 in vitro-Passagen nicht nachzuweisen. Da die Ursprungszelllinien nicht synchronisiert waren, kann dieses Fehlen der Antigenexpression nicht zellzyklusbedingt, sondern dürfte genetisch bedingt sein. Daraus kann geschlossen werden, daß eine klonale Variation innerhalb der chemisch induzierten Gliomlinien in Bezug auf die Expression des Oberflächenantigens, gegen das der monoklonale Antikörper 14 AC1 gerichtet ist, besteht. Ähnliche Unterschiede in der Antigenexpression werden auch von anderen Autoren berichtet (Yeh et al., 1981; Starkey et al., 1982; Dippold et al., 1984). Über eine Heterogenität in der Antigenexpression bei einem Gliom des Menschen unter Verwendung monoklonaler Antikörper berichteten auch Wikstrand et al. (1983). Dieses immunologische Abweichen einzelner Gliompopulationen innerhalb desselben Tumors ist besonders in therapeutischer Hinsicht von Interesse. Aufgrund der heterogenen Antigenität der Gliome dürfte es nicht möglich sein, mittels eines einzigen monoklonalen Antikörpers eine vollständige Markierung eines Tumors zu erzielen, da nicht alle Tumorzellen von dem Antikörper erkannt werden. Durch die gleichzeitige Anwendung mehrerer monoklonaler Antikörper, die verschiedene Strukturen

der Oberfläche der Targetzellen erkennen, könnte möglicherweise die Trefferquote wesentlich erhöht werden.

Die Untersuchungen mit dem radioaktiv markierten monoklonalen Antikörper 14 AC1 zeigen, daß eine Darstellung eines chemisch induzierten Rattenglioms in vivo bei immundefizienten Mäusen möglich ist. Dies wurde zum einen durch externe Szintigraphie am narkotisierten Tier und zum anderen durch Bestimmung der einzelnen Gewebeaktivitäten deutlich. Bei beiden Untersuchungsmethoden waren deutliche Unterschiede in der Anreicherung der Radioaktivität zwischen dem spezifischen monoklonalen Antikörper und dem unspezifischen Maus-IgG festzustellen. Für den spezifischen Antikörper konnte im Vergleich zum unspezifischen eine 10-fach höhere Anreicherung im Tumor festgestellt werden (Prozentsatz der verabreichten Dosis/g Gewebe). Diese Ergebnisse decken sich weitgehendst mit denen von Baldwin et al. (1983) und Ballou et al. (1979). Primus et al. (1977) erzielten mit radioaktiv markierten polyklonalen Antiseren gegen ein carcinoembryonales Antigen in vivo bei Hamstern nur eine 2- bis 4-fache Anreicherung im Vergleich zur Kontrolle. Auch Goldenberg et al. (1974) erzielten mit polyklonalen Antiseren nur eine 5-fache Anreicherung im Tumor. Wesentlich bessere Ergebnisse erzielten andere Autoren bei Verwendung von monoklonalen Antikörpern, wie zum Beispiel Hedin et al. (25-fache Anreicherung, 1982), Moshakis et al. (14-fache Anreicherung, 1981) oder Epenetos et al. (40-fache Anreicherung, 1982b). Die große Schwankungsbreite der Werte hängt einmal von der Stärke der Bindung des Radionuklids an den monoklonalen Antikörper (Bernhard et al., 1983) und zum anderen von der Reinheit des Antikörpers ab. So kann durch Reinigung und Isolierung der monoklonalen Antikörper aus Ascitesflüssigkeit von Mäusen mit Hilfe von Affinitätschromatographiesäulen eine Mitisolierung von unspezifischem Maus-Immunglobulin nicht ausgeschlossen werden (Ballou et al., 1979; Epenetos et al., 1982b). Auch mögliche Unterschiede der Antigenexpression von Tumorzellen in vitro und in vivo müssen beachtet werden (Pimm et al., 1984).

Eine autoradiographische Untersuchung der Tumoren könnte darüber weitere Aufschlüsse geben. Dadurch wäre die Verteilung der Antikörper im Tumor in vivo besser zu erfassen.

Bei der vorliegenden Studie wurden die szintigraphischen Aufnahmen mit der Gammakamera bis zu 96 Stunden nach Antikörperinjektion durchgeführt. Dadurch war eine Subtraktion des "Blutpools" oder des unspezifischen Hintergrundes durch die Doppel-Isotopen-Technik (Ballou et al., 1979) nicht notwendig. Der Tumor war 96 Stunden nach Injektion auch ohne Subtraktion deutlich zu sehen. Durch die Verwendung eines unspezifischen Maus-IgG als Kontrolle konnten unspezifische Faktoren für die Anreicherung der Radioaktivität im Tumor, wie zum Beispiel Blutgefäßversorgung, Zellnekrosen oder Antikörperanreicherung im Interstitium, quantifiziert werden. Die lange Eliminationszeit des nicht tumorgebundenen Antikörpers aus Blut und Organen könnte durch Verwendung von $F(ab')_2$ -Fragmenten des monoklonalen Antikörpers möglicherweise deutlich verkürzt werden. Herlyn et al. (1983) verglichen ^{131}J -markierte monoklonale Antikörper mit deren ^{131}J -markierten $F(ab')_2$ -Fragmenten und fanden in vivo eine größere Spezifität und Selektivität der Fragmente. Auch war die Elimination der $F(ab')_2$ -Fragmente wesentlich schneller als die der intakten Antikörper.

Bei den hier durchgeführten Untersuchungen wurde zur Markierung ^{131}J verwendet. Dies führte nach 96 Stunden aufgrund einer Dejodierung des markierten Antikörpers zu einer hohen Akkumulation von Radioaktivität in der Schilddrüse. Nach Scheinberg et al. (1982) sind daher Jod-Isotope für die externe Szintigraphie nicht sehr geeignet, insbesondere im Hinblick auf klinische Anwendung. ^{125}J hat für den Nachweis mit der Szintillationskamera eine zu niederenergetische Gammaenergie und ^{131}J einen cytotoxischen Betastrahleranteil, der zu einer hohen Strahlenbelastung führt. Bei allen Jod-Isotopen führt die in vivo-Dejodierung des spezifisch gebundenen markierten Antikörpers zu einer Inkorporation von Jod in die Schilddrüse und zur aktiven Exkretion über den Magen-Darm- und den Harntrakt. Dadurch kann die Darstellung eines Tumors

beeinträchtigt werden, insbesondere, wenn er sich im Abdomen befindet. Die Verwendung von radioaktiven Metallchelaten, wie zum Beispiel ^{111}In oder $^{99\text{m}}\text{Tc}$ zur Markierung, könnte diese Nachteile beheben, da ungebundene radioaktive Chelate sofort ausgeschieden werden.

Monoklonale Antikörper wurden auch für die Beeinflussung des Wachstums von Transplantattumoren erfolgreich eingesetzt (Bernstein et al., 1980; Herlyn et al., 1980, 1983; Seto et al., 1983; Adams et al., 1984). Der genaue Mechanismus des antitumoralen Effektes ist noch nicht bekannt. Da der wirksame Antikörper ein $\text{IgG}_{2\text{a}}$ ist, kann er Komplement fixieren (Stanworth et al., 1973). Eine mögliche Beeinflussung des Tumorstwachstums wäre deshalb die direkte Lysis der Gliomzellen in Anwesenheit von Komplement. Nadler et al. (1980) fanden diese Wirkung bei in vivo-Studien mit monoklonalen $\text{IgG}_{2\text{a}}$ -Antikörpern gegen ein lymphom-assoziiertes Antigen. Eine zweite Möglichkeit besteht darin, daß monoklonale Antikörper unter Aktivierung von Lymphocyten bzw. Makrophagen das Tumorstwachstum beeinflussen. Bilzer et al. (1984) konnten mit Hilfe des ADCC-Tests unter Verwendung von Rattenthymuszellen nachweisen, daß der monoklonale Antikörper 14 ACl in vitro eine T-zell-vermittelte cytotoxische Wirkung auf die Gliomzellen entfaltet. Die dritte Möglichkeit wäre, daß der Antikörper allein die Targetzellen in ihrer Proliferation hemmt. Ein Hinweis darauf könnte die von Lederer et al. (1984) nachgewiesene Beeinflussung des Methionin-Stoffwechsels der Gliomzellen 79FR-G-41 durch den Antikörper 14 ACl in vitro sein. Die Zellen könnten durch Membranveränderungen zur Herabsetzung des Stoffwechsels und Eintreten in ihre G_0 -Phase gebracht werden. Daraus kann geschlossen werden, daß die in vivo-Behandlung mit monoklonalen Antikörpern zumindest zu einer Wachstumsdepression der Tumoren führen würde.

Eine Verbesserung der bislang mit nativen Antikörpern erzielten Ergebnisse ist möglicherweise durch Verwendung von "Immuntoxinen" (Vitetta et al., 1983), indem an monoklonale Antikörper Ricin-A- oder Diphtherietoxin-A-Ketten gekoppelt

werden. Bernhard et al. (1983) konnten dadurch die anti-tumorale Wirkung eines monoklonalen Antikörpers gegen ein Meerschweinchen-Hepatocarcinom in vivo signifikant erhöhen.

E. ZUSAMMENFASSUNG

Die Bindungseigenschaften monoklonaler Antikörper gegen experimentelle Gliome wurden unter Verwendung von chemisch induzierten Rattengliomen und dagegen gerichtete monoklonale Antikörper in vitro und in vivo untersucht. Die Anreicherung und Reinigung der Immunglobuline erfolgte durch Ammoniumsulfatpräzipitation und Protein-A-Sepharose-Affinitätschromatographie. Mit Hilfe des Immunodiffusionstests und der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese wurden die Immunglobulin-klassen bzw. Subklassen der Antikörper definiert. Die Bindungseigenschaften lassen sich wie folgt zusammenfassen:

1. Durch den mikro-ELISA und die indirekte Immunperoxidasefärbung (IPF) war in vitro eine deutliche Antigen-Antikörper-Bindungsreaktion festzustellen. Bei der IPF war eine unterschiedliche Antigenexpression der Gliomzellen zu beobachten. Ein Teil der Targetzellen zeigte keine Bindung des Antikörpers an die Zelloberfläche.
2. Dekomplementierte Ascitesflüssigkeit, die durch intraperitoneale Injektion von Zellen des Hybridomklons 14 AC1 produziert worden war, hatte eine komplementabhängige cytotoxische Wirkung in vitro auf alle getesteten Gliomzelllinien, jedoch nicht auf normale Hirnzellen neugeborener Ratten.
3. Durch Inkubation mit antikörperhaltigem Medium war in vitro eine Proliferationsdepression und morphologisch fassbare Veränderung an der Zelloberfläche bei allen getesteten Gliomzelllinien festzustellen.
4. Mit Hilfe des radioaktiv markierten monoklonalen Antikörpers 14 AC1 konnten intramuskulär bei BALB/c-nu/nu-Mäusen transplantierte Gliome deutlich dargestellt werden. Mit radioaktiv markiertem unspezifischem Maus-IgG war eine Darstellung des Tumors nicht möglich.

5. Durch Messung der Organaktivitäten konnte durch Verabreichung des radioaktiv markierten monoklonalen Antikörpers im Vergleich zum radioaktiv markierten unspezifischen Maus-IgG eine 10-fach höhere Anreicherung der Radioaktivität im Tumor erzielt werden.

Die Untersuchungen wurden mit finanzieller Unterstützung durch die W. Sander-Stiftung (Sta-81.007.02) durchgeführt.

SUMMARY

BINDING PROPERTIES OF MONOCLONAL ANTIBODIES AGAINST EXPERIMENTAL GLIOMAS IN VITRO AND IN VIVO

The binding properties of monoclonal antibodies against chemically induced experimental rat gliomas were explored in vivo and in vitro. The antibodies were enriched and purified by means of ammoniumsulfate-precipitation and Protein-A-Sepharose-affinity chromatography. The immunoglobulin classes and subclasses were defined using immunodiffusion-assay and SDS-Polyacrylamid-gelelectrophoresis.

The binding properties were as follows:

1. A clear antigen-antibody binding reaction was seen following micro-ELISA and indirect immunoperoxidase-staining in vitro. After indirect immunoperoxidase staining the glioma cells showed a varied expression of antigen. Some of the target cells didn't bind any antibody to the cell surface.
2. Decomplemented ascitic fluid, produced by intraperitoneal injection of hybridoma clone 14 AC1 cells, showed a complement-dependent cytotoxicity in vitro to all tested glioma lines, but not to normal brain cells from newborn rats.
3. In vitro incubation with antibody-containing medium resulted in a depression in proliferation, and morphological cell surface changes, in all glioma lines tested.
4. Grafted gliomas (i.m.) in BALB/c-nu/nu mice could be clearly identified using radiolabeled monoclonal antibody 14 AC1. This was not possible using radiolabeled non-specific mouse IgG.
5. The accumulation of radioactivity in tumor tissue was ten-fold higher following application of radiolabeled monoclonal antibody 14 AC1, than after application of radiolabeled non-specific mouse IgG.

G. LITERATURVERZEICHNIS

- Adams, D.O., Hall, T., Steplewski, Z., Koprowski, H.: Tumors undergoing rejection induced by monoclonal antibodies of the IgG_{2a} isotype contain increased numbers of macrophages activated for a distinctive form of antibody-dependent cytotoxicity.
Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 81, 3506-3510 (1984)
- Amos, D.B., Bashir, H., Boyle, W., MacQueen, M., Tilikainen, A.: A simple microcytotoxicity test.
Transplantation 7, 220-223 (1969)
- Arklie, J., Taylor-Papadimitriou, J., Bodmer, W., Egan, M., Millis, R.: Differentiation antigens expressed by epithelial cells in the lactating breast are also detectable in breast cancers.
Int. J. Cancer 28, 23-29 (1981)
- Ashwood-Smith, M.J.: Preservation of mouse bone marrow at -70°C with dimethylsulfoxide.
Nature 190, 1204-1205 (1961)
- Baker, M.A., Taub, R.N.: Immunotherapie of human cancer.
Progr. Allergy 17, 227-299 (1973)
- Baldwin, R.W., Embleton, M.J., Pimm, M.V.: Monoclonal antibodies for radioimmunodetection of tumours and for targeting.
Bull. Cancer (Paris) 70, 132-136 (1983)
- Ballou, B., Jaffe, R., Taylor, R.J., Solter, D., Hakala, T.R.: Tumor radioimmunolocalization: Differential antibody retention by antigenic normal tissue and tumor.
J. Immunol. 132, 2111-2116 (1984)

- Ballou, B., Levine, G., Hakala, T.R., Solter, D.: Tumor location detected with radioactively labeled monoclonal antibody and external scintigraphy.
Science, 206, 844-847 (1979)
- Bernhard, M.I., Foon, K.A., Oeltmann, T.N., Key, M.E., Hwang, K.M., Clarke, G.C., Christensen, W.L., Hoyer, L.C., Hanna, M.G., Oldham, R.K.: Guinea pig line 10 hepatocarcinoma model: Characterization of monoclonal antibody and in vivo effect of unconjugated antibody and antibody conjugated to diphtheria toxin A chain.
Cancer Res. 43, 4420-4428 (1983)
- Bernhard, M.I., Hwang, K.M., Foon, K.A., Keenan, A.M., Kessler, R.M., Frinke, J.M., Tallam, D.J., Hanna, M.G., Peters, L., Oldham, R.: Localization of ¹¹¹In- and ¹²⁵I-labeled monoclonal antibody in guinea pigs bearing line 10 Hepatocarcinoma tumors.
Cancer Res. 43, 4429-4433 (1983)
- Bernstein, I., Nowinski, R.C.: Monoclonal antibody treatment of transplanted and spontaneous murine leukemia.
in: Hybridomas in Cancer Diagnosis and Treatment
ed. by Mitchell, M.S., Oettgen, H.F., Raven Press,
New York 97-112 (1982)
- Bernstein, I.D., Tam, M.R., Nowinski, R.C.: Mouse leukemia: Therapie with monoclonal antibodies against a thymus differentiation antigen.
Science, 207, 68-71 (1980)
- Bilzer, Th., Stavrou, D., Dahme, E., Anzil, A.P.: Cell-mediated immune response in rats immunized with chemically modified syngeneic glioma cells. Monitoring by in vivo parameters and in vitro immune cytotoxicity.
Anticancer Res. 2, 345-354 (1982)

- Bilzer, Th., Stavrou, D., Mellert, W.: Cell-mediated lysis of glioma cells directed by monoclonal antibodies.
in press (1984)
- Bourdon, M.A., Coleman, R.E., Blasberg, R.G., Groothuis, D.R., Bigner, D.D.: Monoclonal antibody localization in subcutaneous and intracranial human glioma xenografts: paired label and imaging analysis.
in press
- Bourdon, M.A., Wikstrand, C.J., Furthmayr, H., Matthews, T.J., Bigner, D.D.: Human glioma-mesenchymal extracellular matrix antigen defined by monoclonal antibody.
Cancer Res. 43, 2796-2805 (1983)
- Buchanan, D., Kamarck, M., Ruddle, N.H.: Development of a Protein-A-enzyme immunoassay for use in screening hybridomas.
J. Immunol. Meth. 42, 179-185 (1981)
- Bumol, T.F., Wang, Q.C., Reisfeld, R.A., Kaplan, N.O.: Monoclonal antibody and an antibody-toxin conjugate to a cell surface proteoglycan of melanoma cells suppress in vivo tumor growth.
Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 80, 529-533 (1983)
- Carrel, S., de Tribolet, N., Mach, J.P.: Expression of neuroektodermal antigens common to melanomas, gliomas, and neuroblastomas.
Acta Neuropathol. 57, 158-164 (1982)
- Coakham, H.B.: Surface antigen(s) common to human astrocyroma cells.
Nature 250, 328-330 (1974)

- Coakham, H.B., Kornblith, P.L., Quindien, E.A., Pollok, L.A., Wood, W.C., Harnett, L.C.: Autologous humoral response to human gliomas and analysis of certain cell surface antigens: In vitro study with the use of micro-cytotoxicity and immune adherence assays.
J. Nat. Canc. Inst. 64, 223-233 (1980)
- Coffino, P., Baumal, R., Laskov, R., Scharff, M.D.: Cloning of mouse myeloma cells and detection of rare variants.
J. Cell. Physiol. 79, 429-440 (1972)
- Cornain, S., Carnaud, S., Silverman, D., Klein, E., Rajewsky, M.F.: Spleen-cell reactivity against transplanted neurogenic rat tumors induced by ethylnitrosourea: uncovering of tumor specificity after removal of complement-receptor-bearing lymphocytes.
Int. J. Cancer 16, 301-311 (1975)
- Cravioto, H.: Immunology of experimental brain tumors.
In: H. Waters (ed.) The handbook of cancer immunology, Vol. 3, 329-363. New York-London: Garland STPM Press (1978)
- Dexter, G.L., Spremulli, E.N., Fligiel, Z., Barbosa, J.A., Vogel, R., VanVoorhes, A., Calabresi, P.: Heterogeneity of cancer cells from a single colon carcinoma.
American J. Med. 71, 949-956 (1981)
- Dippold, W.G., Knuth, A., Meyer zum Büschenfelde, K.H.: Inhibition of human melanoma cell growth in vitro by monoclonal anti-G_{D3}-ganglioside antibody.
Cancer Res. 44, 806-810 (1984)
- Dippold, W.G., Lloyd, K.O., Li, L.T.C., Ikeda, H., Oettgen, H.F., Old, L.J.: Cell surface antigens of human malignant melanoma: Definition of six antigenic systems with mouse monoclonal antibodies.
Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 77, 6114-6118 (1980)

Douillard, J.Y., Hoffman, T., Herberman, R.B.: Enzyme-linked immunosorbent assay for screening monoclonal antibody production: use of intact cells as antigen.
J. Immunol. Meth. 39, 309-316 (1980)

Dubois-Dalcq, M., McFarland, H., McFarlin, D.: Protein-A-Peroxidase. A valuable tool for the localization of antigens.
J. Histochem. Cytochem. 25, 1201-1206 (1977)

Eisenbarth, G.S., Rankin, R.B., Haynes, B.F., Fauci, A.S.: A visual assay to monitor purification of cell surface antigens reacting with monoclonal antibodies
J. Immunol. Meth. 39, 387-392 (1980)

Eisenbarth, G.S., Walsh, F.S., Nirenberg, M.: Monoclonal antibody to a plasma membrane antigen of neurons.
Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 76, 4913-4917 (1979)

Elling, H., Stavrou, D.: Über die Antigenität eines chemisch induzierten neurogenen Sarkoms der Ratte.
Vet. Pathol. 17, 477-489 (1980)

Engvall, E., Perlmann, P.: Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Quantitative assay of immunoglobulin G.
Immunochemistry 8, 871-874 (1971)

Epenetos, A.A., Bodmer, W.F., Britton, K.E.: Radioimmuno-detection of cancer.
Eur. J. Clin. Oncol. 18, 1221-1223 (1982a)

Epenetos, A.A., Mather, S., Granowska, M., Nimm, on, C.C., Hawkins, L.R., Britton, K.E., Shepherd, J., Taylor-Papadimitriou, J., Durbin, H., Malpas, J.S., Bodmer, W.F.: Targeting of Iodine-123-labelled tumour-associated monoclonal antibodies to ovarian, breast, and gastrointestinal tumors.
Lancet 999-1004 (1984b)

- Epenetos, A.A., Nimmon, C.C., Arklie, J., Elliott, A.T.,
Hawkins, L.A., Knowles, R.W., Britton, K.E., Bodmer,
W.F.: Detection of human cancer in an animal model using
radio-labelled tumour-associated monoclonal antibodies.
Br. J. Cancer 46, 1-8 (1982c)
- Ey, P.L., Prowse, S.J., Jenkin, C.R.: Isolation of pure IgG₁,
IgG_{2a}, and IgG_{2b} immunoglobulins from mouse serum
using Protein-A-Sepharose.
Immunochem. 15, 429-436 (1978)
- Fabre, J.W.: Differentiation antigens of the human central
nervous system: identification with monoclonal antibodies
and potential clinical value.
In: A.J. McMichael (ed.): Monoclonal antibodies in
clinical medicine. Acad. Press (1982)
- Faraci, R.P.: In vitro demonstration of altered antigenicity
of metastases from a primary methylcholanthrene-induced
sarcoma.
Surgery 76, 469-473 (1974)
- Farrands, P.A., Pimm, M.V., Embleton, M.J., Perkins, A.C.,
Hardy, J.D., Baldwin, R.W., Hardcastle, J.D.: Radio-
immunodetection of human colorectal cancers by an anti-
tumor monoclonal antibody.
Lancet 387-400 (1982)
- Fazekas de St. Groth, S., Scheidegger, D.: Production of
monoclonal antibodies: strategy and tactics.
J. Immunol. Meth. 35, 1-21 (1980)
- Feit, C., Bartal, A.H., Tauber, G., Dymbort, G., Hirsaut, Y.:
An enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the
detection of monoclonal antibodies recognizing surface
antigens expressed on viable cells.
J. Immunol. Meth. 58, 301-308 (1983)

Fey, H., Pfister, H., Messerli, J., Sturzenegger, N., Groli-
mund, F.: Methods of isolation, purification, and
quantitation of bovine immunoglobulins.

Zbl. Vet. Med. 23, 269-300 (1976)

Fields, K.L., Gosling, C., Megson, M., Stern, P.L.: New cell
surface antigens in rat defined by tumors of the nervous
system.

Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 72, 1296-1300 (1975)

Fradet, Y., Cordon-Cardo, C., Thomson, T., Daly, M.E., Whit-
more, W.F., Lloyd, K.O., Melamed, M.R., Old, L.J.:
Cell surface antigens of human bladder cancer defined by
mouse monoclonal antibodies.

Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 81, 224-228 (1984)

Galfre, G., Milstein, C., Wright, B.: Rat x rat hybrid myelomas
and a monoclonal anti-Fd portion of mouse IgG.

Nature 227, 131-133 (1979)

Garrigues, H.J., Tilgen, W., Hellström, I., Hellström, K.E.:
Detection of a human melanoma-associated antigen, p97,
in histological sections of primary human melanomas.

Int. J. Cancer 29, 511-515 (1982)

Gasser, D.L., Winters, A.A., Haas, J.B., McKearn, T.J., Kennet,
R.H.: Monoclonal antibody directed to a B-cell antigen
present in rats, mice, and humans.

Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 76, 4636-4640 (1979)

Gerhard, W., Croce, C.M., Lopes, D., Koprowski, H.: Repertoire
of antiviral antibodies expressed by somatic cell
hybrids.

Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 75, 1510-1514 (1978)

- Ghose, T., Ramakrishnan, S., Kulkarni, P., Blair, A.H.,
Vaughan, K., Nolido, H., Norvell, S.T., Belitsky, P.:
Use of antibodies against tumor-associated antigens
for cancer diagnosis and treatment.
Transplantation Proceedings 13, 1970-1972 (1981)
- Gilliand, D.G., Steplewski, Z., Collier, R.J., Mitchell, K.F.,
Chang, T.H., Koprowski, H.: Antibody-directed cytotoxic
agents: Use of monoclonal antibody to direct the action
of toxin A chains to colorectal carcinoma cells.
Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 77, 4539-4543 (1980)
- Goding, J.W.: Antibody production by hybridomas.
J. Immunol. Meth. 39, 285-308 (1980)
- Goding, J.W.: Use of staphylococcal protein A as an immuno-
logical reagent.
J. Immunol. Meth. 20, 241-253 (1978)
- Goldenberg, D.M., Preston, D.F., Primus, F.J., Hansen, H.J.:
Photoscan localization of GW-39 tumors in hamsters using
radiolabeled anticarcinoembryonic antigen immuno-
globulin G.
Cancer Res. 34, 1-9 (1974)
- Graham, R.C., Lundholm, U., Karnowsky, M.J.: Cytochemical
demonstration of peroxidase activity with 3-amino-ethyl-
carbazole.
J. Histochem. Cytochem. 13, 150-152 (1965)
- Greenwood, F.C., Hunter, W.M.: The preparation of ^{131}I -
labeled human growth hormone of high specific radio-
activity.
Biochem. J. 89, 114-123 (1963)

- Handley, H.H., Glassey, M.C., Cleveland, P.H., Royston, I.:
Development of a rapid microELISA assay for screening
hybridoma supernatants for murine monoclonal antibodies.
J. Immunol. Meth. 54, 291-296 (1982)
- Hedin, A., Wahren, B., Hammarström, S.: Tumor localization
of CEA-containing human tumours in nude mice by means
of monoclonal anti-CEA-antibodies.
Int. J. Cancer 30, 547-552 (1982)
- Hellström, I., Garrigues, H.J., Cabasco, L., Mosley, G.H.,
Brown, J.P., Hellström, K.E.: Studies of a high molecular
weight human melanoma-associated antigen.
J. Immunol. 130, 1467-1472 (1983)
- Hellström, I., Hellström, K.E.: Cell-bound immunity to auto-
logous and syngeneic mouse tumors induced by
methylcholanthrene and plastic disks.
Science, 203, 981-983 (1967)
- Hellström, I., Hellström, K.E., Pierce, G.E., Bill, A.H.:
Demonstration of cell-bound and humoral immunity
against neuroblastoma cells.
Proc. Nat. Acad. Sci. 60, 1231-1238 (1968)
- Hellström, K. E., Hellström, I., Brown, J.P.: Unique and
common tumor specific transplantation antigens of
chemically induced mouse sarcomas.
Int. J. Cancer 21, 317-322 (1978)
- Herbermann, R. B.: Immunogenicity of tumor antigens.
Biochem. Biophys. Acta 473, 93-119 (1977)
- Herlyn, D., Herlyn M., Steplewski, Z., Koprowski, H.:
Monoclonal antibodies in cell-mediated cytotoxicity
against human melanoma and colorectal carcinoma.
Eur. J. Immunol. 9, 657-659 (1979)

- Herlyn, D., Powe, J., Alavi, A., Mattis, J. A., Herlyn, M., Ernst, C., Vaum, R., Koprowski, H.: Radioimmunodetection of human tumor xenografts by monoclonal antibodies. Cancer Res. 43, 2731-2736 (1983)
- Herlyn, D. M., Steplewski, Z., Herlyn, M. F., Koprowski, H.: Inhibition of growth of colorectal carcinoma in nude mice by monoclonal antibody. Cancer Res. 40, 717-721 (1980)
- Herlyn, M., Clark, W. H., Mastrangelo, M. J. M., Guerry, duPont, Elder, D. E., LaRossa, D., Hamilton, R., Bondi, E., Tuthhill, R., Steplewski, Z., Koprowski, H.: Specific immunoreactivity of hybridoma-secreted monoclonal anti-melanoma antibodies to cultered cells and freshly derived human cells. Cancer Res. 40, 3602-3609 (1980)
- Herrmann, F., Kommischke, B., Sieber, G., Rühl, H.: Heterogeneity of T-cell neoplasias as defined by monoclonal antibodies. Klin. Wochenschr. 61, 807-812 (1983)
- Hengartner, H., Luzzati, A. L., Schreier, M.: Fusion of in vitro immunized lymphoid cells with X63-Ag8. Curr. Top. Microbiol. Immunol. 81, 92-99 (1978)
- Heppner, G. H., Dexter, D. L., DeNucci, T., Miller, F. R., Calabresi, P.: Heterogeneity in drug sensitivity among cell subpopulations of a single mammary tumor. Cancer Res. 38, 3758-3763 (1978)
- Humphrey, J. H., White, R. G.: Kurzes Lehrbuch der Immunologie. Stuttgart, Thieme (1971)

- Jonak, Z. L.: Isolation of monoclonal antibodies from supernatant by $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ precipitation.
In: R. H. Kennett (ed.): Monoclonal antibodies, Plenum Press (1980)
- Katz, D. H., Benacerraf, B. (eds.): The role of the products of the histocompatibility gene complex in immunresponse.
Acad. Press New York (1976)
- Kearney, J. F., Radbruch, A., Liesegang, B., Rajewsky, K.:
A new mouse myeloma cell line that has lost immunoglobulin expression but permits the construction of antibody-secreting hybrid cell lines.
I. Immunol. 123, 1548-1550 (1979)
- Kennett, R. H., Gilbert, F.: Hybrid myelomas producing antibodies against a human neuroblastoma antigen present on fetal brain.
Science, 203, 1120-1121 (1979)
- Kennett, R. H., Jonak, Z. L., Bechtol, K. B.: Monoclonal antibodies against human tumor-associated antigens.
In: R. H. Kennett (ed.): Monoclonal antibodies, Plenum Press (1980)
- Kimball, P. M., Brattain, M. G.: Isolation of a cellular subpopulation from a human colonic carcinoma cell line.
Cancer Res. 40, 1574-1579 (1980)
- Klein, G.: Tumor antigens.
Amer. Rev. Microbiol. 20, 223-252 (1966)

- Klein, J., Hauptfeld, V.: Evidence for a third Ir-associated histocompatibility region in the H2-complex of the mouse.
Immunogenetics 1, 45-56 (1974)
- Köhler, G.: Immunoglobulin chain loss in hybridoma lines.
Proc. Nat. Acad. Sci. USA 77, 2197-2199 (1980)
- Köhler, G., Howe, S. C., Milstein, C.: Fusion between immunoglobulinsecreting and nonsecreting myeloma cell lines.
Eur. J. Immunol. 6, 292-295 (1976a)
- Köhler, G., Milstein, C.: Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity.
Nature 256, 495-497 (1976b)
- Köhler, G. Shulman, M. J.: Cellular and molecular restrictions of the lymphocyte fusion.
Curr. Top. Microbiol. Immunol. 81, 143-151 (1978)
- Koprowski, H., Steplewski, Z., Herlyn, D., Herlyn, M.: Study of antibodies against human melanoma produced by somatic cell hybrids.
Proc. Nat. Aca. Sci. USA 75, 3405-3409 (1978)
- Koprowski, H., Steplewski, Z., Mitchell, K., Herlyn, M., Herlyn, D., Fuhrer, P.: Colorectal carcinoma antigens detected by hybridoma antibodies.
Somatic Cell Genetics 5, 957-972 (1979)
- Kornblith, P. L., Dohan, W. C., Whiteman, B. O.: Human astrocytoma: serum-mediated immunologic response.
Cancer 6, 1512-1519 (1974)

- Laemmli, U. K.: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of Bacteriophage T4.
Nature 227, 680-685 (1970)
- Laerum, O. D., Mork, S., Rajewsky, M. S., Hansteen, I. L., Haugen, A.: Heterogeneity and selection of neoplastic neurogenic rat cells in vivo and in vitro.
Anticancer Res. 3, 187-194 (1983)
- Landsdorp, P. M., Astaldi, G. C. B., Oosterhof, F., Janssen, M. C., Zeijlemaker, W. P.: Immunoperoxidase procedures to detect monoclonal antibodies against cell surface antigens. Quantitation of binding and staining of the individual cells.
J. Immunol. Meth., 393-405 (1980)
- Lederer, T., Stavrou, D., Mellert, W., Zänker, K. S.: Induction of surface changes, membrane traffic alteration and growth delay on rat glioma cells by a monoclonal antibody.
In Press (1984)
- Levkovits, I.: Introduction of antibody-forming cell clones in microcultures.
Eur. J. Immunol. 2, 360-366 (1972)
- Lemke, H., Hämmerling, G. J., Höhmann, C., Rajewsky, K.: Hybrid cell lines secreting monoclonal antibody specific for major histocompatibility antigens of the mouse.
Nature 271, 249-251 (1978)

- Libert, a., Ghanem, G., Arnould, R., Vercammen, A., Carrel, S.,
Lejeune, F.: Monoclonal antibodies to human melanoma
associated antigens: Study of their specificity and
visualization at the cellular level of the antigenic
distribution.
Anticancer Res. 3, 219-226 (1983)
- Lindmo, T., Davies, C., Rofstad, E. K., Fodstad, O., Sundan,
A.: Antigen expression in human melanoma cells in
relation to growth conditions and cell-cycle
distribution.
Int. J. Cancer 33, 167-171 (1984)
- Littlefield, J. W.: Selection of hybrids from mastings of
fibroblasts in vitro and their presumed recombinations.
Science 145, 709 (1964)
- Lostrom, M., Stone, M. R., Tam, M., Burnette, W. N., Pinter,
A., Nowinski, R. C.: Monoclonal antibodies against murine
leukemia viruses: Identification of six antigenic
determinants on the p15(E) and gp(70) envelope proteins.
Virology 98, 336-350 (1979)
- Mach, J. P., Buchegger, F., Forni, M., Ritschard, J., Berche,
C., Lumbroso, J. D., Schreyer, M., Girardet, C., Accolla,
R. S., Carrel, S.: Use of radiolabelled monoclonal
anti-CEA antibodies for the detection of human carcinomas
by external photoscanning and tomoscintigraphy.
Immunol. Today 2, 239-249 (1981)
- Mahaley, M. S.: Immunological aspects of the growth and
development of human and experimental brain tumors.
The Experimental Biology of Brain Tumors.
Springfield, Thomas (1972)

- Marrack, D., Kubala, M., Correy, P., Leavens, M., Howze, J.,
Dewey, W., Bale, W. F., Spar, I. L.: Localization of
intracranial tumors.
Cancer 20, 751-755 (1967)
- Mattes, M. J., Cairncross, J. G., Old, L. J., Lloyd, K. O.:
Monoclonal Antibodies to three widely distributed human
cell surface antigens.
Hybridoma 2, 253-264 (1983)
- McKearn, T. J.: Method for growing hybridomas in rats or mice.
Kennett, R. H., McKearn, T. J., Bechtol, K. B. (eds.)
Monoclonal antibodies, Plenum Press (1980)
- Miller, F. R., Heppner, G. H.: Immunologic heterogeneity of
tumor cell subpopulations from single mouse mammary
tumor.
J. Nat. Canc. Inst. 63, 1457-1463 (1979)
- Minna, J. D., Cuttitta, F., Rosen, S., Bunn, P. A., Carney,
D. N., Gazdar, A. F., Krasnow, S.: Methods for
production of monoclonal antibodies with specificity
for human lung cancer cells.
In Vitro 17, 1058-1070 (1981)
- Mitchell, K. F., Fuhrer, J. P., Steplewski, Z., Koprowski, H.:
Structural characterisation of the "melanoma-specific"
antigen detected by monoclonal antibody 691I5Nu-4-B.
Molecular Immunology 18, 207-218 (1981)
- Morris, R. E., Thomas, P. T., Hong, R.: Cellular enzyme-linked
immunospecific assay (CELISA).
Human Immunol. 5, 1- 19 (1982)

- Moshakis, V., McIlhinney, R. A., Neville, A. M.: Cellular distribution of monoclonal antibodies in human tumors after i.v. administration.
Br. J. Cancer 44, 663-669 (1981a)
- Moshakis, V., McIlhinney, R. A., Rhagavan, D., Neville, A. M.: Localization of human tumor xenografts after i.v. administration of radiolabelled monoclonal antibodies.
Br. J. Cancer 44, 91-99 (1981b)
- Muralt, B., de Tribolet, N., Diserens, A. C., Carrel, S., Mach, J. P.: Reaktivität of antiglioma monoclonal antibodies for a large panel of cultured gliomas and other neuroectoderm derived tumors.
In press
- Nadler, L. M., Stashenko, P., Hardy, R., Kaplan, W. D., Button, L. N., Kufe, W., Antman, K. H., Schlossman, S. F.: Serotherapy of a patient with monoclonal antibody directed against a human lymphoma-associated antigen.
Cancer Res. 40, 3147-3154 (1980)
- von Nagell, J. R., Kim, E., Primus, F. J., Bennet, S., DeLand, F. H., Goldenberg, D. M.: Radioimmunodetection of primary and metastatic ovarian cancer using radiolabeled antibodies to carcinoembryonic antigen.
Cancer Res. 40, 502-506 (1980)
- Nakane, P. K., Pierce, G. B.: Enzyme labelled antibodies. Preparation and application for localization of antigens.
J. Histochem. Cytochem. 14, 929-931 (1966)

- Natali, P. G., Viora, M., Nicotra, M. R., Giacomini, P., Bigotti, A., Ferrone, S.: Antigenic heterogeneity of skin tumors of nonmelanocyte origin: analysis with monoclonal antibodies to tumor-associated antigens and to histocompatibility antigens.
J. Nat. Canc. Inst. 71, 439-447 (1983)
- Nexo, B.A.: A plaque assay for murine leukemia virus using enzyme-coupled antibodies.
Virology 77, 849-852 (1977)
- North, S.M.: Monoclonal antibodies to rat sarkomata II.
Immunology 49, 667-671 (1983)
- North, S.M., Styles, J.M., Hobbs, S.M., Dean, C.J.: Monoclonal antibodies to rat sarkomata I.
Immunology 47, 397-405 (1982)
- Old, L.J., Boyse, E.A.: Immunology of experimental tumors.
Amer. Rev. Med. 15, 167-186 (1969)
- Olsnes, S.: Directing toxins to cancer cells.
Nature 290, 84 (1981)
- Olsson, L., Kaplan, H.S.: Human-human hybridomas producing monoclonal antibodies of predefined antigenic specificity.
Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 77, 5429-5431 (1980)
- Olsson, L., Kronstrom, H., Cambon de Mouzin, A., Honsik, C., Brodin, T., Jakobsen, B.: Antibody-producing human-human hybridomas.
J. Immunol. Meth. 61, 17-32 (1983)
- Ouchterlony, Ö.: Diffusions-in-gel-methods for immunological analysis II.
Progr. Allergy 6, 30-154 (1962)

- Pateraki, E., Guesdon, J.L., Serie, C., Avrameas, S.:
TERELISA: the ELISA test performed in Terasaki plates.
J. Immunol. Meth. 46, 361-368 (1981)
- Paul, J.: Zell- und Gewebekulturen.
De Gryter New York - Berlin 1980
- Pearse, A.G.E.: Histochemistry.
Churchill Livingstone 1972
- Pfreundschuh, M., Shiku, H., Takahashi, T., Ueda, R.,
Ransohoff, J., Oettgen, H.F., Old, L.J.: Serological
analysis of cell surface antigens of malignant human
brain tumors.
Proc. Nat. Acad. Sci.U.S.A. 75, 5122-5216 (1978)
- Pimm, M.V., Embleton, M.J., Perkins, A.C., Price, M.R., Robins,
R.A., Robinson, G.R., Baldwin, R.W.: In vivo localization
of anti-osteogenic sarkoma 791T monoclonal antibody in
osteogenic sarkoma xenografts.
Int. J. Cancer 30, 75-85 (1982)
- Phillips, J., Alderson, T., Sikora, K., Watson, J.:
Localization of malignant glioma by a radiolabelled
human monoclonal antibody.
J. Neurol. Neurol. Psych. 46, 388-392 (1983)
- Possner, M.R., Antoniou, D., Griffin, J., Schlossman, S.F.,
Lazarus, H.: An enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)
for the detection of monoclonal antibodies to cell
surface antigens on viable cells.
J. Immunol. Meth. 48, 23-31 (1982)
- Pressman, D., Hill, R.F., Foote, F.W.: The zone of loca-
lization of anti-mouse kidney serum as determined by
radioautographs.
Science 109, 65-66 (1949)

- Pressman, D., Korngold, L.: The in vivo localization of anti-Wagner-osteogenic-sarkoma antibodies.
Cancer 6, 61623 (1953)
- Primus, F.J., MacDonald, R., Goldenberg, D.M., Hansen, H.J.: Localization of GW-39 human tumors in hamsters by affinity-purified antibody to carcinoembryonic antigen.
Cancer Res. 37, 1544-1547 (1977)
- Ralph, P., Nakoinz, I.: Cell-mediated lysis of tumor targets directed by murine monoclonal antibodies of IgM and all IgG isotypes.
J. Immunol. 131, 1028-1031 (1983)
- Reddy, M.M., Pinyavat, N., Grieco, M.C.: Interleukin 2 augmentation of natural killer cell activity in homosexual men with aquired immune deficiency syndrome.
Infection and Immunity 44, 339-343 (1984)
- Ross, A.H., Mitchell, K.F., Steplewski, Z., Koprowski, H.: Identification and isolation of melanoma-associated antigens with monoclonal antibodies.
Hybridoma 1, 413-421 (1982)
- Scheinberg, D.A., Strand, M., Gansow, O.A.: Tumor imaging with radioactive metal chelates conjugated to monoclonal antibodies.
Science 215, 1511-1513 (1982)
- Schimmelpfennig, L., Langenberg, U., Peters, H.: Macrophages overcome mycoplasma infections of cells in vitro.
Nature 285, 661-662 (1980)
- Schnegg, J.F., Diserens, A.C., Carrel, S., Accolla, R.S., de Tribolet, N.: Human glioma-associated antigens by monoclonal antibodies.
Cancer Res. 41, 1209-1213 (1981)

- Schnegg, J.F., de Tribolet, N., Diserens, A.C., Martin-Achard, A., Carrel, S.: Characterization of a rabbit anti-human malignant glioma antiserum.
Int. J. Cancer 28, 265-269 (1981)
- Secher, D.S.: Monoclonal antibodies by cell fusion.
Immunol. Today 2, 22-27 (1980)
- Seeger, R.C., Rosenblatt, H.M., Imai, K., Ferrone, S.: Common antigenic determinants on human melanoma, glioma, neuroblastoma, and sarcoma cells defined with monoclonal antibodies.
Cancer Res. 41, 2714-2717 (1981)
- Seto, M., Takahashi, T., Nakamura, S., Matsudaira, Y., Nishizuka, Y.: In vivo antitumor effects of monoclonal antibodies with different immunoglobulin classes.
Cancer Res. 43, 4768-4733 (1983)
- Sheik, K.M.A., Apuzzo, M., Kochsiek, K.R., Weiss, M.H.: Malignant glial neoplasms: Definition of a humoral host response to tumor-associated antigens.
J. Biol. Med. 50, 397-403 (1977)
- Shulman, M., Wilde, C.D., Köhler, G.: A better cell line for making hybridomas secreting specific antibodies.
Nature 276, 269-270 (1978)
- Sikora, K., Alderson, T.: Human hybridomas from malignant gliomas.
The Lancet 2, 11-14 (1982)
- Sikora, K., Phillips, J.: Human monoclonal antibodies to glioma cells.
Br. J. Cancer 43, 105-107 (1981)

- Springer, T., Galfre, G., Secher, D.S., Milstein, C.:
Monoclonal xenogeneic antibodies to murine cell surface
antigens: identification of novel leukocyte
differentiation antigens.
Eur. J. Immunol. 8, 539-551 (1978)
- Stanworth, D.R., Turner, M.W.: Immunochemical analysis of
immunoglobulins and their subunits.
in: Weir, D.M. (ed): Handbook of Experimental Immunology
Blackwell Scientific Publications (1973)
- Stavrou, D.: Mögliche immunologische Aspekte bei experimen-
tellen neurogenen Tumoren.
Zbl. Allg. Path. 120, 535 (1976)
- Stavrou, D., Anzil, A.P., Elling, H.: Tumor specific fluo-
rescent and complement-dependent cytotoxic antibodies
in the serum of rats with chemically induced brain
gliomas.
Acta Neuropath. 43, 111-117 (1978a)
- Stavrou, D., Bilzer, Th., Anzil, A.P., Hulten, M.,
Kaldrymidou, E.: Reaktivität von tumor-infiltrating,
blood, spleen, and lymph node lymphocytes against
syngeneic glioma target cells.
Anticancer Res. 1, 125-133 (1981)
- Stavrou, D., Bilzer, Th., Hulten, M., Zänker, K.S., Anzil,
A.P., Haglid, K.G., Dahme, E.: Immunological aspects
of experimental brain tumors.
Anticancer Res. 2, 151-156 (1982)
- Stavrou, D., Elling, H., Haglid, K.G.: Demonstration of
humoral antibodies against autologous cells in
experimental rabbit gliomas.
J. Neuropath. Exp. Neurol. 37, 694 (1978b)

- Stavrou, D., Elling, H., Osterkamp, U.: Zytotoxische Antikörper gegen experimentelle Gliome.
Zbl. Allg. Path. 121, 568 (1977)
- Stavrou, D., Hulten, M., Anzil, A.P., Bilzer, Th.: The humoral response of rats immunized with chemically modified syngeneic brain cells and glioma cells.
Int. J. Cancer 26, 629-637 (1980)
- Stavrou, D., Mellert, W., Bilzer, Th.: Monoclonal antibody treatment of cultivated glioma cells.
J. Cancer. Res. Clin. Oncol. 107, 27 (1984)
- Stavrou, D., Süß, C., Bilzer, T., Kummer, U., de Tribolet, N.: Monoclonal antibodies reactive with glioma cell lines from experimental brain tumors.
Eur. J. Cancer Clin. Oncol. 19, 1439 (1983)
- Starkey, J.R., Davis, W.C., Talmadge, J.E.: Immunoselection of tumor variants resistant to antibody-mediated cytotoxicity.
Cancer Immunol. Immunother. 14, 124-131 (1982)
- Steele, G.J., Sjögren, H.O.: Crossreacting tumor-associated antigen(s) among chemically induced rat coloncarcinomas.
Cancer Res. 34, 1801-1807 (1974)
- Strand, M., Scheinberg, D.A., Gansow, O.A.: Monoclonal antibody conjugates for tumor imaging and therapy.
in: Beers, R.F.(ed.): Gene transfer and transformation
Raven Press, New York 385-393 (1984)
- Suzuki, N., Withers, H.R., Koehler, M.W.: Heterogeneity and variability of artificial lung colony-forming ability among clones from mouse fibrosarcoma.
Cancer Res. 38, 3349-3351 (1978)

Suter, L., Brügggen, J., Sorg, C.: Use of an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for screening of hybridoma antibodies against cell surface antigens.

J. Immunol. Meth 39, 407-411 (1980)

de Tribolet, N., Carrel, S.: Human glioma tumor-associated antigens.

Cancer Immunol. Immunother. 9, 207-211 (1980)

Trouillas, P.: Carcinofetal antigen in rat glial tumors.

Lancet 2, 552 (1971)

Trowbridge, I.S.: Interspecies spleen-myeloma hybrid producing monoclonal antibodies against mouse lymphocyte surface glycoprotein, T200.

J. Exp. Med. 313-322 (1978)

Tung, A.S., Ju, S., Sato, S., Nisonoff, A.: Production of large amounts of antibodies in individual mice.

J. Immunol. 116, 676-681 (1976)

Underwood, P.A., Kelly, J.F., Harman, D.F., MacMillan, H.M.: Use of Protein A to remove immunoglobulins from serum in hybridoma culture media.

J. Immunol. Meth. 60, 33-45 (1983)

Vitetta, E.S., Krolick, K.A., Miyama-Inaba, M., Cushley, W., Uhr, J.W.: Immunotoxins: A new approach to cancer therapy.

Science 219, 644-650 (1983)

Vollmers, H.P., Birchmeier, W.: Monoclonal antibodies inhibit the adhesion of mouse B16 melanoma cells in vitro and block the lung metastasis in vivo.

Proc. Nat. Acad. Sci. USA 80, 3729-3733 (1983)

- Wahlström, T., Linder, E., Saksela, E., Westermark, E.:
Tumor-specific membrane antigens in established cell
lines from gliomas.
Cancer 34, 274-279 (1974)
- Warnatz, H.: Tumorummunologie.
Stuttgart Thieme (1975)
- Weij, J.P., van der Veen, C., de Vries, E., Cats, A.: The use
of a peroxidase-anti-peroxidase complex for the
visualization of monoclonal antibodies on the ultra-
struktural level.
Clin. exp. Immunol. 54, 819-826 (1983)
- Weinstein, J.N., Parker, R.J., Keenan, A.M., Dower, S.K.,
Morce, H.C., Sieber, S. M.: Monoclonal antibodies in
the lymphatics: Toward the diagnosis and therapy of
tumor metastasis.
Science 218, 1334-1337 (1982)
- Weinstein, J.N., Steller, M.A., Keenan, A.M., Covell, D.G.,
Key, M.E., Sieber, S.M., Oldham, R.K., Hwang, K.M.,
Parker, R.J.: Monoclonal antibodies in the lymphatics:
Selective delivery to lymph node metastases or a solid
tumor.
Science 222, 423-426 (1983)
- Wikstrand, C.J., Bigner, D.D.: Expression of human fetal brain
antigens by human tumors of neuroectodermal origin as
defined by monoclonal antibodies.
Cancer Res. 42, 267-275 (1982)
- Wikstrand, C.J., Bigner, D.D.: Surface antigens of human glioma
cells shared with normal and fetal brain.
Cancer Res. 39, 3235-3243 (1979)

Wikstrand, C.J., Bigner, S.H., Bigner, D.D.: Demonstration of complex antigenic heterogeneity in a human glioma cell line and eight derived clones by specific monoclonal antibodies.

Cancer Res. 43, 3327-3334 (1983)

Wikstrand, C.J., Mahaley, M.S., Bigner, D.D.: Surface antigenic characteristic of human glial brain tumor cells.

Cancer Res. 37, 4267-4275 (1977)

Wood, W.C., Morton, D.L.: Microcytotoxicity test: Detection in sarcoma patients of antibody cytotoxic to human sarcoma cells.

Science 170, 1318-1320 (1970)

Yeh, M.Y., Hellström, I., Hellström, K.E.: Clonal variation in expression of a human melanoma antigen defined by a monoclonal antibody.

J.Immunol. 126, 1312-1317 (1981)

Yeh, M.J., Hellström, I., Brown, J.P., Warner, G.H., Hansen, J.A., Hellström, K. E.: Cell surface antigen of a human melanoma identified by monoclonal antibody.

Proc. Nat. Acad. Sci. USA 76, 2927-2931 (1979)

Herrn Prof. Dr. Dr. D. Stavrou danke ich sehr herzlich für die Überlassung des Dissertationsthemas und die jederzeit gewährte freundliche Unterstützung.

Frau D. Wallmann, Frau Dr. R. Senekowitsch und Frau S. Möllenstädt sowie die gesamte Abteilung für Nuklearbiologie der Gesellschaft für Strahlen- und Umweltforschung, München, waren mir bei der Durchführung der Experimente eine wertvolle Hilfe.

Für ihre technische Hilfeleistung bedanke ich mich bei Frau A. Lechner.

Auch allen Ungenannten, die mir in verschiedenster Weise beim Gelingen der Dissertation halfen, möchte ich an dieser Stelle danken.

Lebenslauf

1957 geboren am 6. Mai in Horb am Neckar
 Vater: Erwin Mellert, Ingenieur
 Mutter: Elisabeth Mellert, geb. Kleinmann

1964-1967 Besuch der Grundschule in Horb am Neckar

1967-1976 Besuch des Gymnasiums in Horb am Neckar

1976 18.5. Reifezeugnis

1976-1977 Ableistung des Grundwehrdienste:

1977-1982 Studium der Tiermedizin an der Ludwig-Maximilians-
 Universität München

1983 1.1. Beginn der Dissertation und Tätigkeit als
 wissenschaftliche Hilfskraft am Insitut für Tier-
 pathologie, Abteilung funktionelle Pathologie
 (Prof. Dr. Dr. D. Stavrou), der Universität
 München

 20.1. Approbation als Tierarzt

1984 1.7. Anstellung als wissenschaftlicher Mitarbeiter
 im Institut für Biologie, Abteilung Pathologie,
 der Gesellschaft für Strahlen- und Umwelt-
 forschung, München

